



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του

Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ- ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ,

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»

ΡΑΦΑΗΛΙΑ Α. Α. ΜΠΕΤΑ

ΔΟΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ

AtHESPERIN

Μεταπτυχιακή διατριβή

2016

Δομικές και λειτουργικές μελέτες της AtHESPERIN

Structural and functional studies of AtHESPERIN

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 τον Οκτώβριο του 2014 έως τον Ιούνιο του 2016, υπό την επίβλεψη του Επικ. Καθηγητή Βιοχημείας Δρ Μπαλατσού Νικόλαου.

*Αφιερώνεται στη γιαγιά μου,
Φωτεινή Γαλανάκη*

*«Η επιστήμη φέρνει τους ανθρώπους πιο κοντά
στο Θεό»
Louis Pasteur (1822-1895)*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους των οποίων οι υποδείξεις, η βοήθεια και η υποστήριξη υπήρξαν πολύτιμες για την διεκπεραίωση αυτής της εργασίας. Κατ' αρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές μου. Πιο συγκεκριμένα, ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Δρ Νικόλαο Μπαλατσό, για την ανάθεση του θέματος, την εμπιστοσύνη του, την καθοδήγησή και την υπομονή του, το Δρ Δημήτριο Λεωνίδα για την καθοδήγησή του, τις συμβουλές του και τη συνεισφορά του στην ομαλή διεξαγωγή της παρούσας διπλωματικής εργασίας, και την Δρ Καλλιόπη Παπαδοπούλου 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 Βασιλική Σκαμνάκη, για την κατανόηση, τις πολύτιμες συμβουλές της επί της απομόνωσης και του καθαρισμού ενζύμων και την άριστη συνεργασία της. Επίσης, ευχαριστώ ιδιαίτερα τον επίκουρο καθηγητή Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής, Δρ Ηλία Μυλωνή για την πρόθυμη βοήθεια και την άριστη συνεργασία του.

Ειδικότερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα του τμήματος Αθανάσιο Κυρίτση για την καθοδήγηση, τις συμβουλές, τη συμπαράστασή του και την εξαιρετική παρέα του, τον υποψήφιο διδάκτορα Γεώργιο Στραβοδήμο, για την προσοχή του, τη βοήθειά και καθοδήγησή του, τα εποικοδομητικά διαλείμματά μας και την εξαιρετική του παρέα και την υποψήφια διδάκτορα Δήμητρα Χατζηλεοντιάδου για τη βοήθειά της, την καθοδήγησή της, την ευθύτητά της και την ευχάριστη παρέα της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψ. διδάκτορα Παναγιώτη Μαραγκοζίδη για τις συμβουλές του, την πρόθυμη βοήθειά που μου προσέφερε και την ευχάριστη παρέα του και τη Δρ Αναστασία Καντσάδη για τη συνεργασία της. Ευχαριστώ τις φίλες και συναδέλφους Ειρήνη Παπαναστάση, Θεοδώρα Σολοβού και Χαρίκλεια Ψαχούλα για την εξαιρετική συνεργασία και παρέα τους.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω τους φίλους μου και συναδέλφους, Ευθύμιο Κυριάκη, Ιωάννα-Μαρία Γκοτινάκου, Μαρία Χ. Χαραλάμπους και Κωνσταντίνο Τσιλαφάκη για την ανεπανάληπτη συντροφιά τους και την οικογενειακή ατμόσφαιρα που δημιουργήσαμε στη Λάρισα. Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου, τη μητέρα μου, Κατερίνα, τον πατέρα μου, Άγγελο και την αδερφή μου, Μαλεβή, καθώς συνεχίζουν να με στηρίζουν ηθικά και υλικά όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	6
I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
II. ABSTRACT	8
2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
2.1 Ο ημερονύκτιος (κιρκάδιος) ρυθμός	9
2.1.1 Το κιρκάδιο ρολόι στα φυτά	11
2.1.2 Το κιρκάδιο ρολόι στον άνθρωπο.....	12
2.2 Συμμεταγραφικές τροποποιήσεις	14
2.2.1 Πολυαδενυλίωση.....	15
2.2.2 Αποικοδόμηση του mRNA.....	16
2.2.3 Απαδενυλίωση.....	18
2.2.4 Το παράδειγμα της Nocturnin.....	22
2.2.5 Η HESPERIN από το φυτό <i>Arabidopsis thaliana</i>	25
3 ΣΚΟΠΟΣ	27
3.1 Πειραματική προσέγγιση	27
4 ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ	28
4.1 Υλικά	28
4.1.1 Αντιδραστήρια.....	28
4.1.2 Βακτηριακά στελέχη.....	29
4.1.3 Πλασμιδιακοί φορείς	29
4.1.4 Ένζυμα	31
4.1.5 Δείκτες Μοριακών Βαρών.....	31
4.1.6 Υγρή Χρωματογραφία	31
4.1.7 Διαλύματα	32
4.1.8 Οργανολογία.....	36
4.2 Μέθοδοι	36
4.2.1 Υποκλωνοποίηση cDNA αλληλουχίας της AtHESP με τη μέθοδο In-fusion HD Cloning.....	37
4.2.2 Παρασκευή επιδεκτικών προς χημικό μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων.....	42
4.2.3 Μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηρίων με τον επιθυμητό πλασμιδιακό φορέα.....	43
4.2.4 Πέψη ανασυνδυασμένου φορέα pGEX-6p-1 με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	44
4.2.5 Στοχευμένη μεταλλαξιγένεση.....	44
4.2.6 Έλεγχος προτύπου έκφρασης της ανασυνδυασμένης HESP	48
4.2.7 Ηλεκτροφόρηση	51
4.2.8 Υπερέκφραση της AtHESP από τα κύτταρα BL21-Gold (DE3)	56
4.2.9 Λύση βακτηριακών κυττάρων	57
4.2.10 Κινητικές μελέτες.....	63
5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	71
5.1 Υποκλωνοποίηση cDNA αλληλουχίας της AtHESP με τη μέθοδο In-fusion HD Cloning ..	71
5.2 Βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου απομόνωσης της AtHESP	72
5.2.1 Υπερέκφραση της 6xHis-AtHESP	72
5.2.2 Υπερέκφραση της GST-AtHESP	76

5.3	Κινητικές μελέτες	82
5.3.1	Η AtHESP είναι ένα αλλοστερικό ένζυμο	82
5.3.2	Η μετάλλαξη συγκεκριμένων αμινοξέων μειώνει τη δραστηριότητα της AtHESP	83
5.3.3	Αξιοποίηση ιόντων Mg(II) και Mn(II) από την AtHESP	84
5.4	Η AtHESP είναι ένα ολιγομερές ένζυμο	86
5.4.1	Χρωματογραφία μοριακής διήθησης	86
5.4.2	Ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες	87
6	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	90
7	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	96
8	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	101

I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο έλεγχος της αποικοδόμησης του ευκαρυωτικού mRNA είναι ένα σημαντικό στοιχείο της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Το πρώτο και καθοριστικό βήμα της αποικοδόμησης του mRNA αποτελεί η απομάκρυνση της πολυ(A) ουράς του (απαδενυλίωση), από μια οικογένεια ενζύμων που ονομάζονται απαδενυλάσες. Τουλάχιστον εννέα τέτοια ένζυμα έχουν βρεθεί για τον άνθρωπο, ενώ το *Arabidopsis thaliana* μπορεί να έχει ίσως και 26 απαδενυλάσες. Ο αυξημένος αριθμός απαδενυλασών πιθανόν αντανakλά 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 απαδενυλίωση στα φυτά δεν έχει μελετηθεί σε βάθος. Πρόσφατα ταυτοποιήθηκε μια νέα απαδενυλάση 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 ολιγομερές 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 (κirkάδιος) 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 δραστηριότητας των μεταβολικών ενζύμων ενός μύκητα έως τον περίπλοκο κύκλο ύπνου-εγρήγορσης των ανθρώπων. Οι εσωτερικοί ταλαντωτές που ρυθμίζουν αυτούς τους ημερήσιους ρυθμούς ονομάζονται κirkάδια ρολόγια¹ [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 κirkάδια ρολόγια τα οποία ελέγχουν γεγονότα όπως η μεταγωγή σήματος, η γονιδιακή έκφραση, η παραγωγή ορμονών, η δραστηριότητα των νευρώνων, και πολλές πλευρές της συμπεριφοράς [2]. Τα κirkάδια ρολόγια είναι ενδογενείς αυτοσυντηρούμενοι ταλαντωτές που καθοδηγούν μια ευρέως φάσματος ρυθμική έκφραση γονιδίων, εναρμονίζοντας έτσι το μεταβολισμό και τη φυσιολογία [3]. Πρόσφατες μελέτες έχουν διαφωτίσει με πολλές λεπτομέρειες περί των μοριακών μηχανισμών που απαρτίζουν το κirkάδιο ρολόι, αλλά το πώς ο μηχανισμός του κirkάδιου 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 κirkάδιου ρολογιού. Πρόσφατες αναλύσεις μικροσυστοιχιών σε εύρος γονιδιώματος ανέδειξαν ένα πλήθος γονιδίων που υπόκεινται σε κirkάδιο έλεγχο.

Οι μεταγραφικοί και μετα-μεταγραφικοί μηχανισμοί που διέπουν τα διαφορετικά πρότυπα έκφρασης γενικά δεν είναι γνωστοί [2], ωστόσο, παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση παροδικής γονιδιακής έκφρασης για τη σωστή λειτουργία του κirkάδιου ρολογιού και ιδιαίτερα για το μοριακό μηχανισμό του ρολογιού. Στα θηλαστικά ο μοριακός μηχανισμός που διέπει τους κirkάδιους 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 ι-

¹ Κirkάδιος, αγγλ. circadian > λατιν. circa diem: ελλ. περίπου μια μέρα

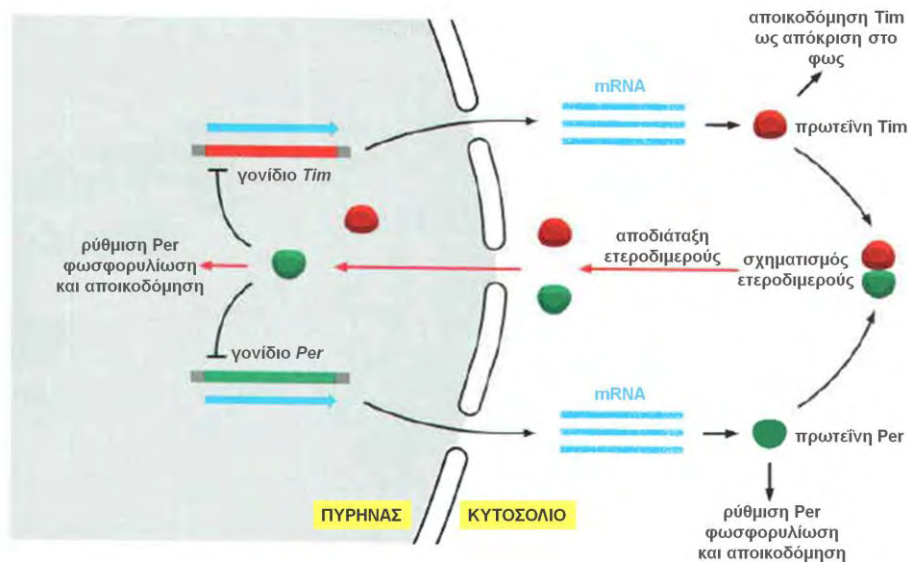
στούς έχουν αναδείξει χιλιάδες ρυθμικών μεταγράφων που εμπλέκονται στον καθημερινό έλεγχο του μεταβολισμού [3].

Θα περίμενε κανείς, πως το κικκάδιο 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 πτερυγών και των όρχεων, διατηρούν έναν κικκάδιο κύκλο όταν έχουν ανατετημηθεί (dissected) από το υπόλοιπο 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 κικκάδιου ρολογιού, και μελέτες σε μεγάλη ποικιλία οργανισμών έχουν αναδείξει πολλές από τις βασικές αρχές και τα μοριακά συστατικά του κικκάδιου ρολογιού. Για τα ζώα, οι περισσότερες από τις πληροφορίες που είναι γνωστές προέρχονται από έρευνες στη *Drosophila* με μεταλλάξεις που είτε καθιστούν το κικκάδιο 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 κικκάδιο 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 [1].



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). [1]

1.1.1 Το κερκάδιο 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 άνθων και αποθηκευτικών οργάνων. Το 1936 προτάθηκε από τον *Bünning* ότι το κερκάδιο ρολόι των φυτών, με την 24ωρη περίοδό του, χρησιμοποιείται στις φωτοπεριοδικές αντιδράσεις για τη μέτρηση του μήκους της ημέρας [4].

Οι ταλαντωτές σε κάποια συστήματα σταματούν να λειτουργούν είτε όταν υπάρχει συνεχής φωτισμός (*Drosophila*, τρωκτικά, *Neurospora*) ή εάν υπάρχει συνεχές σκοτάδι (*cyanobacteria*), ενώ, οι ταλαντωτές των φυτών συνεχίζουν να λειτουργούν ακόμη και κάτω από συνθήκες συνεχούς φωτός ή σκοταδιού [5].

Τα φυτά και τα ζώα εκδηλώνουν εμφανείς ρυθμούς που ταιριάζουν στις ετήσιες εποχιακές αλλαγές στο περιβάλλον. Στα φυτά, αυτές οι εποχιακές αλλαγές περιλαμβάνουν τη δημιουργία άνθων στην καταλληλότερη περίοδο του χρόνου ώστε να εξασφαλιστεί η αναπαραγωγή. Οι μελέτες σε φυτά ανέδειξαν πως οι εποχιακοί ρυθμοί ελέγχονται από το μήκος της ημέρας, ένα γαινόμενο που ονομάζεται φωτοπεριοδισμός. Ο *Bünning* ήταν ο πρώτος που πρότεινε πως τα κερκάρια συστήματα χρονομέτρησης επίσης ελέγχουν και τη φωτοπεριοδική χρονομέτρηση [5].

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 ανάπτυξης 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 [4].

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 [4].

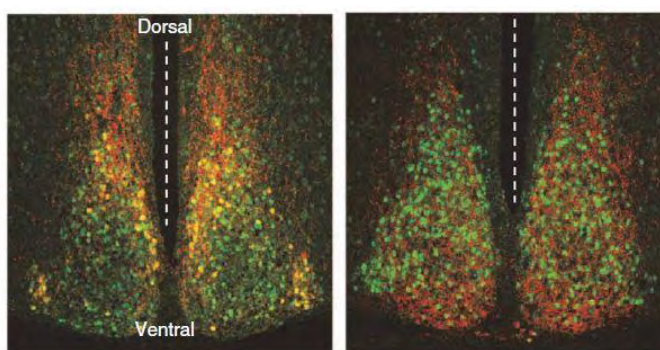
1.1.1.3 Το κερκάρδιο ρολόι ρυθμίζει τη φωτοπεριοδική απόκριση

Τα φυτά, καθώς αντιλαμβάνονται τη διάρκεια της νύχτας, συγχρονίζονται με την κατάλληλη εποχή του χρόνου για να ξεκινήσει ευνοϊκά η διαδικασία της άνθισης. 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 κερκάρδιο 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 [4].

1.1.2 Το κερκάρδιο ρολόι στον άνθρωπο

Οι κirkάδιοι ρυθμοί περιλαμβάνουν γεγονότα όπως η γονιδιακή έκφραση, σωματικές εκδηλώσεις όπως είναι η έκκριση ορμονών και συμπεριφορές των οργανισμών όπως είναι ο ύπνος. Η διατήρηση των ρυθμών αυτών οφείλεται σε κυτταρικούς και μοριακούς μηχανισμούς του ρολογιού που ενέχονται σε όλους τους ιστούς στο σώμα και συντονίζονται σε ολόκληρο τον οργανισμό από περιβαλλοντικά ερεθίσματα (όπως το φως), νευροχημικούς παράγοντες ή άλλα ερεθίσματα.

Στο κirkάδιο σύστημα των θηλαστικών, οι κεντρικοί ρυθμοί που σχετίζονται με ημερονύκτιες συμπεριφορές (ύπνος/ αφύπνιση και ο καρδιακός ρυθμός) ελέγχονται σε μεγάλο βαθμό από τον υπερχιασματικό πυρήνα (*superchiasmatic nucleus –SCN*)² (βλ. Σχήμα 1). Χειρουργικά πειράματα σε τρωκτικά εντόπισαν τον αμφιβληστροειδή ως το κύριο ανατομικό σημείο φωτουποδοχής. Τα φωτεινά σήματα μεταφέρονται από τον αμφιβληστροειδή στον κύριο ταλαντωτή στον υπερχιασματικό πυρήνα [5]. Παρότι πολλοί ιστοί εκτός του υπερχιασματικού πυρήνα εμφανίζουν ταλάντωση στη γονιδιακή έκφραση των γονιδίων του ρολογιού, η φάση της έκφρασης (δηλαδή, η χρονική στιγμή των μεγίστων και ελαχίστων της γονιδιακής έκφρασης) ποικίλει με τρόπο ειδικό για κάθε είδος ιστού [6]. Παρότι ο υπερχιασματικός πυρήνας είναι απαραίτητος για να διατηρηθεί η συγχρονισμένη γονιδιακή έκφραση του ρολογιού σε όλο το σώμα, αλλά καθώς δεν παρέχει σχεδόν καμία άμεση νεύρωση με τους περιφερικούς και κεντρικούς ιστούς εκτός του υποθαλάμου [6], ο συντονισμός των μηχανισμών των ταλαντωτών στους περιφερικούς ιστούς θεωρείται πως σε ένα μεγάλο ποσοστό ελέγχεται από κυκλοφορούντες νευροχημικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που ελέγχονται άμεσα από τον υπερχιασματικό πυρήνα (π.χ. μελατονίνη, κορτιζόλη) [5].



Σχήμα 1. Νευροανατομική δομή του υπερχιασματικού πυρήνα του υποθαλάμου ποντικού. Ο υπερχιασματικός πυρήνας ή πυρήνες εντοπίζονται εκατέρωθεν των δυο πλευρών της τρίτης κοιλίας (διακεκομμένες γραμμές) και πάνω από το οπτικό χίασμα. Η τρίτη κοιλία βρίσκεται στο διεγκέφαλο του πρόσθιου εγκεφάλου μεταξύ του δεξιού και αριστερού θαλάμου. Οι υπερχιασματικοί πυρήνες χωρίζονται λειτουργικά σε ραχιαία και κοιλιακή πλευρά που εν μέρει χαρακτηρίζονται από έκφραση συγκεκριμένων νευροπεπτιδίων, τα οποία

² Ο υπερχιασματικός πυρήνας εντοπίζεται στον πρόσθιο υποθάλαμο και ανταποκρίνεται σε φωτεινά ερεθίσματα που λαμβάνει από τον αμφιβληστροειδή [5] Harmer SL, Panda S, Kay SA. Molecular bases of circadian rhythms. Annual review of cell and developmental biology 2001; 17:215-53.

αντικατοπτρίζουν ένα συζευγμένο δίκτυο ταλάντωσης. Κόκκινο χρώμα, ραχιαία περιοχή: βασοπρεσίνη, κόκκινο χρώμα, κοιλιακή περιοχή: αγγειοδραστικά πεπτίδια [7, 8].

Τα τελευταία χρόνια, η κορτικοστερόνη, η κύρια γλυκοκορτικοειδής ορμόνη στα τρωκτικά, έχει βρεθεί πως δρα ως παράγοντας συντονισμού της γονιδιακής έκφρασης γονιδίων του ρολογιού στο ήπαρ, στους νεφρούς, στους πνεύμονες, στον κερατοειδή χιτώνα και τους σιελογόνους αδένες [6].

Οι κirkάδιοι ρυθμοί, έχει δειχθεί πως έχουν ουσιαστικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις όπου κατ' επανάληψη διαταράσσονται ή αποσυντονίζονται. Κύρια παραδείγματα ατόμων που υποβάλλονται σε συνεχείς αλλαγές των κirkάδιων παραγόντων συγχρονισμού όπως η έκθεση στο φως και η ώρα του φαγητού, αποτελούν οι εργαζόμενοι με βάρδιες, οι πιλότοι και οι αεροσυνοδοί. Αυτά τα επαγγέλματα, φαίνεται να εμφανίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο για διάφορα προβλήματα υγείας όπως η παχυσαρκία, οι καρδιακές παθήσεις και ο διαβήτης. Πληθώρα στοιχείων δείχνουν πως ένας καίριος ρόλος του κirkάδιου ρολογιού είναι η ρύθμιση των μεταβολικών διεργασιών. Επιπλέον, τα μεταβολικά και κirkάδια συστήματα φαίνεται να ρυθμίζονται με αμοιβαίο τρόπο, με την πρόσληψη της τροφής να παίζει κύριο ρόλο στην καθοδήγηση των περιφερικών ρυθμών ενώ τα σήματα που προέρχονται από το φως στον εγκέφαλο δρουν ώστε να επηρεάζουν την πρόσληψη τροφής. Αυτός ο μηχανισμός του ρολογιού είναι συντηρημένος σε μεγάλο βαθμό σε ένα μεγάλο εύρος οργανισμών και αποτελείται από ένα συνδυασμό θηλιών θετικής και αρνητικής ανατροφοδότησης που δρουν ώστε να επαχθεί ή όχι η έκφραση γονιδίων στόχων (και εν τέλει η παραγωγή πρωτεϊνών) με ένα ρυθμικό τρόπο [9].

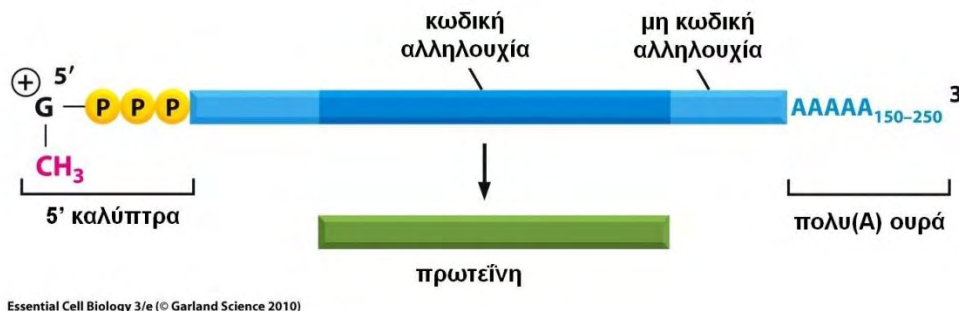
1.2 Συμμεταγραφικές τροποποιήσεις

Ένα αρτιγενές *RNA* ονομάζεται πρώιμο μετάγραφο. Πιθανώς η πιο εκτενής επεξεργασία μεταγράφων συμβαίνει στα ευκαρυωτικά *mRNA* και *tRNA* των ευκαρυωτών και προκαρυωτών [10, 11]. 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 ανακύκλωσης των *RNA* παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της σταθερότητας των επιπέδων τους και το ρυθμό με τον οποίο τα κύτταρα σταματούν την έκφραση ενός γονιδίου του οποίου το προϊόν δε χρειάζεται πλέον το κύτταρο.

Στις συμμεταγραφικές τροποποιήσεις (co-transcriptional modifications) περιλαμβάνεται η διαδικασία του ματίσματος, και η προσθήκη της καλύπτρας στο 5' άκρο του *mRNA*, η οποία είναι ένα κατάλοιπο 7-μεθυλογουανοσίνης, και της πολυ(A) ουράς που αποτελείται από μια σειρά 80-250 αδενυλικών καταλοίπων στο 3' άκρο του *mRNA* [10]. Η πολυαδενυλίωση είναι ένα υποχρεωτικό χαρα-

κτηριστικό της επεξεργασίας των πυρηνικών mRNA και καταλύεται από την πολυ(A) πολυμεράση [12]. Ο κύριος ρόλος της ύπρξης της 5' καλύπτρας και της ουράς πολυ(A) είναι κυρίως για την προστασία από την ενζυμική αποικοδόμηση [10].



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

1.2.1 Πολυαδενυλίωση

Ο κύριος ρόλος της πολυ(A) ουράς είναι η σταθεροποίηση του mRNA, προστατεύοντάς το από την αποικοδόμηση εφόσον συνδέεται με την πολυ(A) συνδεόμενη πρωτεΐνη (*PABP*). Πειραματικά προκύπτει ότι η απουσία της πολυ(A) ουράς οδηγεί σε μείωση της ικανότητας του mRNA να μεταφράζεται, το ίδιο και η απουσία της *PABP*. Σχεδόν όλα τα κυτταρικά mRNA περιέχουν πολυ(A) ουρά. Εξάιρεση αποτελούν τα mRNA που κωδικοποιούν τις ιστόνες των μεταζώων, χωρίς ο ρόλος της απουσίας της πολυ(A) ουράς να είναι πλήρως κατανοητός [13].

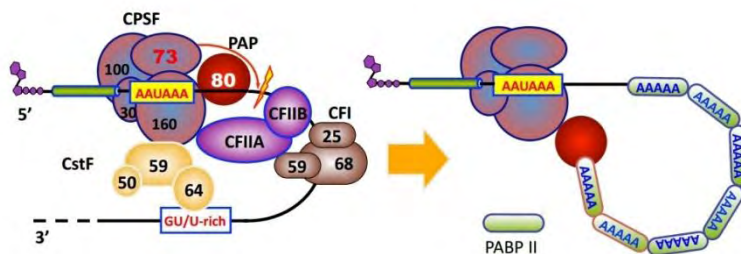
Η διεργασία του 3' άκρου που οδηγεί στην πολυαδενυλίωση είναι μια διαδικασία που αποτελείται από δυο αντιδράσεις. Αρχικά γίνεται τμήση του RNA και δημιουργείται ένα νέο 3'-OH άκρο και ακολουθεί η αντίδραση της πολυαδενυλίωσης. Η διεργασία αυτή απαντάται σε όλα σχεδόν τα mRNA των ευκαρυωτικών οργανισμών (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(A) θέσεων, των θέσεων, δηλαδή, όπου θα δημιουργηθεί η πολυ(A) ουρά. Η αλληλουχία βρίσκεται 10-30 νουκλεοτίδια ανοδικά της πολυ(A) θέσης. Η αλληλουχία AAUAAA σε συνδυασμό με τα καθοδικά στοιχεία ολοκληρώνουν τον καθορισμό της θέσης τμήσης και της αντίδρασης πολυαδενυλίωσης. Έχουν αναγνωρισθεί δύο κύριοι τύποι καθοδικών στοιχείων, ο πρώτος είναι μια αλληλουχία από 4 έως 5 κατάλοιπα U. Ο δεύτερος συνιστά συνήθως μια περιοχή πλούσια σε G/U. Και οι δύο τύποι αλληλουχιών εντοπίζονται σε μια περιοχή εύρους 30 νουκλεοτιδίων καθοδικά από τη θέση πολυ(A). Η απόσταση της AAUAAA από τα καθοδικά στοιχεία καθορίζει την περιοχή όπου θα γίνει η τμήση.

Η αλληλουχία πολυ(A) δεν κωδικοποιείται στο DNA, αλλά προστίθεται στο mRNA, στον πυρήνα, μετά τη μεταγραφή. Η προσθήκη της πολυ(A) ουράς καταλύεται από την πολυ(A)-τελική-

αδενοσινοτρανσφεράση ή πολυ(A) πολυμεράση η οποία προσθέτει ~200 κατάλοιπα A 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(A) ουρά. Η τμήση του πρόδρομου RNA δημιουργεί ένα ανοδικό θραύσμα, το οποίο πολυαδενυλιώνεται αμέσως από την πολυ(A) πολυμεράση.

Σε φυσιολογικές συνθήκες, το ένζυμο δεν έχει ιδιαίτερη προτίμηση για πρόσδεση στο RNA και δεν εμφανίζει ιδιαίτερη δράση πολυμεράσης. Προσθέτει μονομερή κατάλοιπα A, 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(A) 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 [14].



Εικόνα 3. Επισκόπηση της αντίδρασης της πολυαδενυλίωσης. CPSF: (Cleavage and polyadenylation specificity factor), παράγοντας τμήσης και πολυαδενυλίωσης, PAP: (poly(A) polymerase), πολυ(A) πολυμεράση, CF: (cleavage factor) παράγοντας τμήσης, CstF: (cleavage-stimulating factor) διεγείρων παράγοντας τμήσης, PABPII: (poly(A) binding protein) πρωτεΐνη πρόσδεσης στην πολυ(A) ουρά [15].

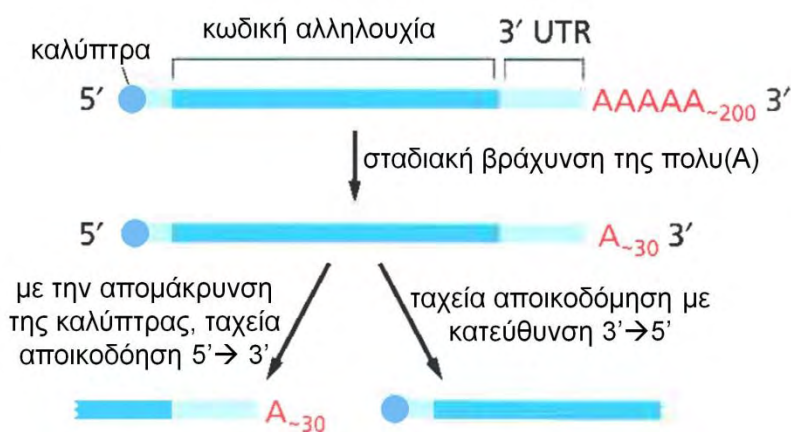
1.2.2 Αποικοδόμηση του mRNA

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(A) ουράς από μια εξωνουκλεάση, μια διαδικασία που ξεκινά

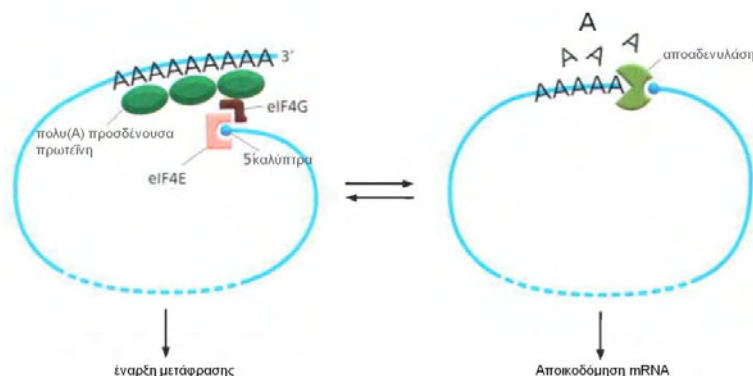
νάει αμέσως μόλις το *mRNA* φτάσει στο κυτταρόπλασμα. Η βράχυνση αυτή λειτουργεί σα χρονομετρητής και μετρά αντίστροφα τη διάρκεια ζωής του κάθε *mRNA* μορίου. Μόλις η ουρά πολυ(A) έχει μειωθεί σε κρίσιμο σημείο (περίπου 25 νουκλεοτίδια στον άνθρωπο) τα δυο μονοπάτια αποκλίνουν. Στη μια περίπτωση, η 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(A) 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(A) που λειτουργεί σαν κατώφλι και οδηγεί σε αποικοδόμηση με κατεύθυνση 3' προς 5', το οποίο μπορεί να οφείλεται και στις πολυ(A) προσδένουσες πρωτεΐνες. Η απαδενυλάση προσδένεται και με την 3' πολυ(A) ουρά και την 5' καλύπτρα, και αυτό το σήμα μπορεί να είναι αυτό που σηματοδοτεί την απομάκρυνση της καλύπτρας μετά τη βράχυνση της πολυ(A) 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 κύτταρο 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(A) 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(A) ουράς ανταγωνίζονται άμεσα το μηχανισμό που μεταφράζει το *mRNA* και επομένως, οι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της μετάφρασης ενός *mRNA* έ-

χουν 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(A) ουρά, χρησιμοποιούνται και για την έναρξη της μετάφρασης και την αποικοδόμηση του *mRNA* που εξαρτάται από την απαδενυλίωση. Η απαδενυλίωση που βραχύνει την πολυ(A) ουρά σε κατεύθυνση 3' προς 5' σχετίζεται με την καλύπτρα στο 5' άκρο [1].

Παρότι η βράχυνση της πολυ(A) 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(A) 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].

1.2.3 Απαδενυλίωση

Η γονιδιακή έκφραση ρυθμίζεται σε πολλά επίπεδα. Ένας κρίσιμος παράγοντας που ελέγχει την έκφραση ενός γονιδίου είναι η συγκέντρωση του *mRNA* του συγκεκριμένου γονιδίου στο κύτταρο. Η συγκέντρωση οποιουδήποτε μορίου εξαρτάται από δυο παράγοντες: το ρυθμό σύνθεσής του και το ρυθμό αποικοδόμησής του. Όταν η σύνθεση και η αποικοδόμηση ενός *mRNA* είναι σε ισορροπία, τότε η συγκέντρωση του *mRNA* διατηρείται σταθερή. Μια αλλαγή σε οποιαδήποτε διαδικασία μπορεί να οδηγήσει είτε σε συσσώρευση ή έλλειψη του *mRNA*. Τα μονοπάτια αποικοδόμησης του *mRNA* εξασφαλίζουν ότι τα διάφορα *mRNA* δεν συσσωρεύονται στο κύτταρο και οδηγούν στη σύνθεση μη απαραίτητων πρωτεϊνών [10]. Δυναμικές αλλαγές στα μήκη των πολυ(A) ουρών των *mRNA* καταλύονται από διάφορα ένζυμα που ονομάζονται απαδενυλάσες. Η διαμόρφωση της πολυ(A) ουράς ενός

mRNA είναι ένα ευρύ μέσο ελέγχου της παραγωγής πρωτεϊνών και της σταθερότητας του *mRNA* [16]. Στον πυρήνα, με την διαδικασία της απαδενυλίωσης περιορίζονται οι νεοπροστιθέμενες πολυ(A) ουρές, στο κατάλληλο μήκος. Οι πολυ(A) ουρές, όταν είναι σε ένα συγκεκριμένο μήκος, είναι απαραίτητες για την έξοδο του *mRNA* από τον πυρήνα και όταν αυτό φτάσει στο κυτταρόπλασμα του προσδίδουν σταθερότητα και έναυσμα για μετάφραση. Τα *mRNA* αποικοδομούνται στο κυτταρόπλασμα με συνεχή βράχυνση της πολυ(A) ουράς κατά τη διάρκεια ζωής του *mRNA*. Τα επόμενα βήματα της αποικοδόμησης των *mRNA* καθυστερούν έως ότου η απαδενυλίωση να ξεπεράσει ένα ορισμένο όριο· έτσι, η απαδενυλίωση μπορεί να θεωρηθεί και ως χρονομετρητής της αποικοδόμησης του *mRNA* και η ίδια η πολυ(A) ουρά μια τροποποίηση που διατηρεί σταθερό το *mRNA* [12].

1.2.3.1 Ρύθμιση της απαδενυλίωσης

Μελέτες έχουν δείξει ότι οι *RNA*-συνδεόμενες πρωτεΐνες (*RNA-binding proteins, RBPs*) μπορούν να επηρεάσουν δραματικά τη σταθερότητα των *mRNAs* [17, 18]. Αυτές δεν επιτρέπουν μόνο τη διακύμανση των χρόνων ημιζωής των *mRNAs* [19], αλλά, επίσης, είναι ικανές να ελέγχουν το ρυθμό αποικοδόμησης συγκεκριμένων *mRNAs* ως απόκριση σε διαφορετικά ερεθίσματα [20]. Οι απαδενυλάσες συνήθως αποτελούν τμήμα συμπλόκων. Οι παρακείμενες υπομονάδες, επηρεάζουν τη δραστικότητα των απαδενυλασών. 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 [21].

Η ρύθμιση της δραστικότητας των απαδενυλασών κρίνεται απαραίτητη, καθώς συνθήκες ανεξέλεγκτης απαδενυλίωσης θα οδηγούσαν σε καταστροφή και θάνατο του κυττάρου. Σταθερά και μεταγραφικά ενεργά *mRNAs* πρέπει να προστατευθούν από την απαδενυλίωση ενώ τα ασταθή και μη φυσιολογικά θα πρέπει να απαδενυλιώνονται και να οδηγούνται στην αποικοδόμηση. Ο ρυθμός της απαδενυλίωσης 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 απαδενυλίωση τους. Αυτά τα στοιχεία αναγνωρίζονται από παράγοντες οι οποίοι στρατολογούν τις απαδενυλάσες προωθώντας έτσι την απαδενυλίωση. Παραδείγματα παραγόντων που δεσμεύονται στις 3'-UTR περιοχές των *mRNA*, αποτελούν τα *miRNAs* και οι CUG-BP, PUF και CPEB πρωτεΐνες [16, 22, 23].

Ρύθμιση της απαδενυλίωσης 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 επαναενεργοποίησης των απαδενυλιωμένων και αδρανών, αλλά κατά τα άλλα άθικτων, κυτταροπλασματι-

κών *mRNA*, που καθοδηγείται από την παρουσία των στοιχείων κυτταροπλασματικής απαδενυλίωσης (*cytoplasmic polyadenylation element -CPE*) στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή των *mRNAs* [24]. 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 [16, 25-29].

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 απαδενυλίωσης επηρεάζεται από δύο μορφές χωρικού ελέγχου: τον πυρηνοκυτταροπλασματικό διαχωρισμό των απαδενυλασών και την εντόπισή τους σε κοκκία. Στην πρώτη περίπτωση, προβλήματα σωστού διαχωρισμού των απαδενυλασών μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος μπορούν να αποβούν μοιραία για την τύχη *mRNAs* που δεν θα έπρεπε να αποικοδομηθούν. Από τη άλλη μεριά, συγκεκριμένες απαδενυλάσες εντοπίζονται σε ενδοκυτταρικά κοκκία, τα οποία περιέχουν κατασταλαμένα *mRNAs*, τα οποία στη συνέχεια μπορούν να ενεργοποιηθούν. Η συνεντόπιση αυτών των απαδενυλασών με τα υποστρώματά τους πιθανότατα διευκολύνει την κινητική της απαδενυλίωσης [16].

1.2.3.2 Απαδενυλάσες

Ως απαδενυλάσες ορίζουμε τις εξωριβονουκλεάσες που αποικοδομούν την πολύ(A) ουρά των *mRNAs* με κατεύθυνση 3'→5' απελευθερώνοντας 5'-AMP. Οι απαδενυλάσες 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 απαδενυλάσες χωρίζονται σε δυο υπερ-οικογένειες, την οικογένεια DEDD ή την EEP (ενδονουκλεάσες- εξωνουκλεάσες-φωσφατάσες). Οι ουρές πολυ(A) που προστίθενται σε πολλά πυρηνικά, μη κωδικά RNA επίσης απομακρύνονται μέσω

απαδενυλίωσης. Το εξώσωμα του πυρήνα εμπλέκεται ισχυρά σε αυτού του είδους την απαδενυλίωση, πιθανότατα με μια εξωνουκλεάση τύπου DEDD [16].

1.2.3.2.1 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 [30]. Μέλη αυτής της ομάδας είναι και οι οικογένειες *POP2* (επίσης γνωστή και ως *CAF1*), *CAF1Z*, *PARN* και *PAN2* [16, 30].

1.2.3.2.2 Οικογένεια EEP

Τα ένζυμα τύπου *EEP* έχουν συντηρημένα καταλυτικά κατάλοιπα *Asp* και *His* στις επικράτειες νουκλεάσης τους. Στα ένζυμα *EEP* ανήκουν και οι απαδενυλάσες *CCR4*, *Nocturnin*, *ANGEL* και 2' φωσφοδιεστεράση (*2'PDE*) [16, 30].

ΠΙΝΑΚΑΣ Ι. ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑ ΤΩΝ ΑΠΑΔΕΝΥΛΑΣΩΝ

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

Οι απαδενυλάσες από κάθε είδος κατηγοριοποιήθηκαν είτε προς την οικογένεια DEDD (Asp-Glu-Asp-Asp) είτε προς την οικογένεια εξωνουκλεασών-ενδονουκλεασών-φωσφατασών βάσει των αμινοξικών αλληλουχιών των επικρατειών εξωνουκλεάσης τους. Τα είδη όπου έχει αποδειχθεί ενζυμική δραστηριότητα επισημαίνονται με +, με + επισημαίνονται τα είδη όπου προβλέπεται να υπάρχει ενζ. δραστηριότητα και με - επισημαίνονται τα είδη στα οποία δεν έχει καθοριστεί η ενζ. δραστηριότητα. Sc: *S.cerevisiae*, Ce: *C. elegans*, Dm: *D.melanogaster*, Xl: *X.laevis*, Mm: *M. musculus*, Hs: *H.sapiens* [16].

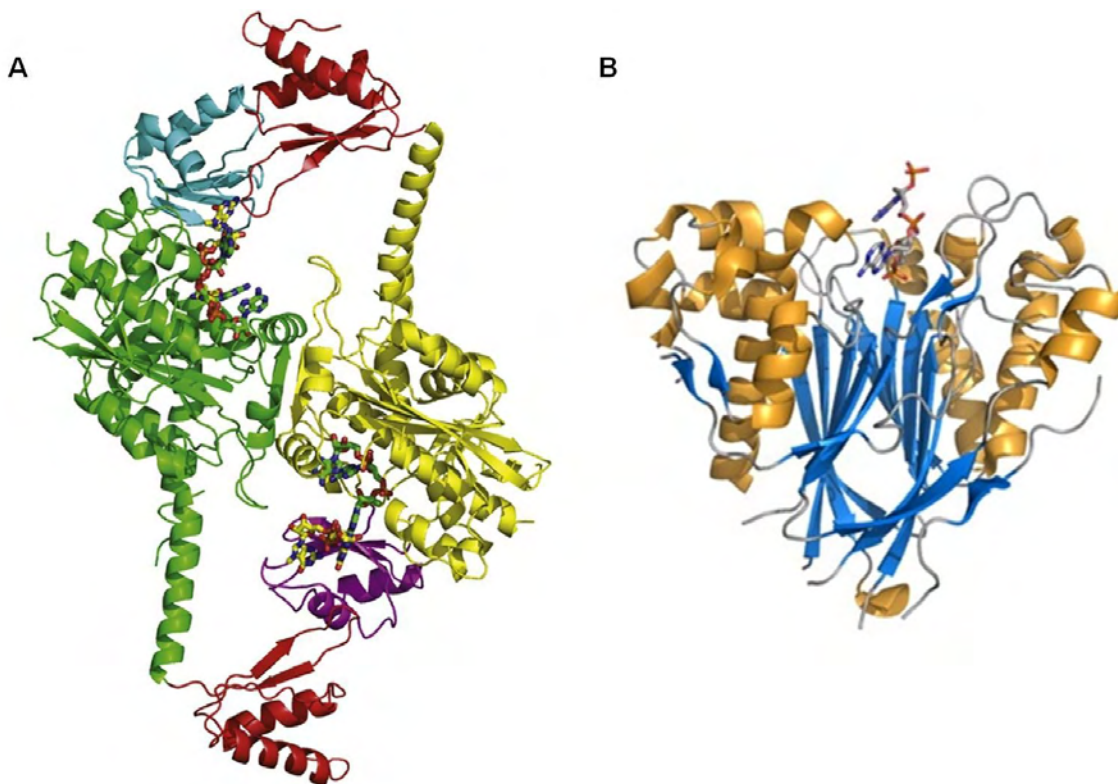
1.2.3.3 Τρόπος δράσης

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι απαδενυλάσες 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- φω-

σφατασών, ανήκουν ένζυμα τα οποία έχουν συντηρημένα κατάλοιπα Asp και His στις επικράτειες νουκλεάσης τους, στην τάξη αυτή ανήκει ο CCR4 (*C*arbon *C*atabolite *R*epressor-4) [12, 16, 31].

Η δραστηριότητα της PARN (βλ. Εικόνα 6, A) διεγείρεται μετρίως από την αλληλεπίδρασή της με την καλύπτρα στο 5' άκρο των mRNA. Η καλύπτρα προσδένεται στην RRM επικράτεια με συγγένεια της τάξης λίγων μM , συγγένεια η οποία είναι αρκετά ασθενέστερη σε σύγκριση με τη συγγένεια της τάξης των nM των "κανονικών" πρωτεϊνών που προσδένονται στην καλύπτρα (cap binding proteins) [14].

Ο CCR4 (βλ. Εικόνα 6, B) είναι μια Mg^{+2} εξαρτώμενη 3' εξωνουκλεάση ειδική για πολυ(A). Παρότι δεν έχουν αναλυθεί άμεσα τα νουκλεοτίδια που απομακρύνονται μέσω της αντίδρασης, η αντίδραση φαίνεται να συμβαίνει κατά ένα νουκλεοτίδιο τη φορά, και η οικογένεια στην οποία ανήκει το ένζυμο υποδεικνύει ότι συμβαίνει αντίδραση υδρόλυσης απελευθερώνοντας 5' AMP [12].

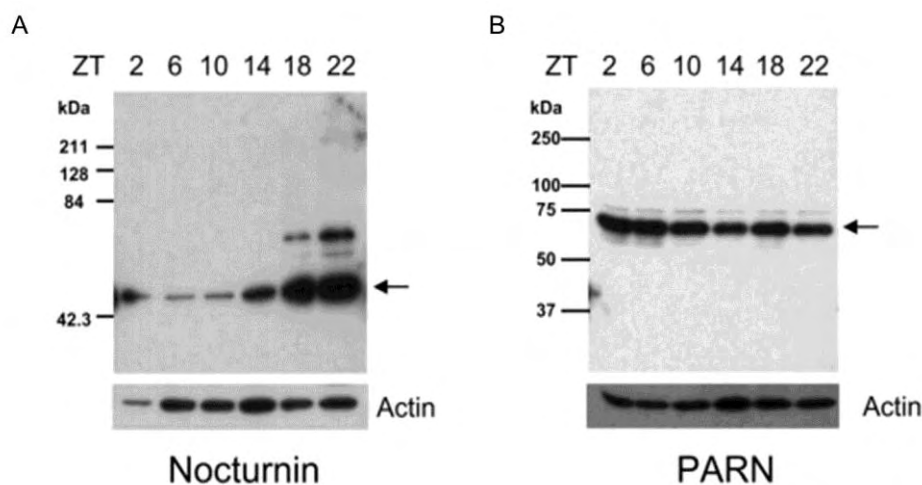


Εικόνα 6. A. Τρισδιάστατη απεικόνιση της δομής της πολυ(A) εξειδικευμένης ριβολουκλεάσης (PARN), B. Τρισδιάστατη δομή του CCR4) [12].

1.2.4 Το παράδειγμα της *Nocturnin*

Η *Nocturnin* ταυτοποιήθηκε χάρη στο ρυθμικό πρότυπο έκφρασής της. Στην προσπάθεια της επιστημονικής ομάδας των Green C.B. και Besharse J.C. να κατανοήσουν τη μοριακή φύση του ρο-

λογιού στον αμφιβληστροειδή, πραγματοποίησαν σάρωση διαφορικής απεικόνισης³ και απομόνωσαν ένα γονίδιο με έντονη κιρκάδια ρυθμικότητα στον αμφιβληστροειδή του *Xenopus* και του οποίου η λειτουργία δεν ήταν από την αρχή ξεκάθαρη [33, 34]. Η ομοιότητα της *Nocturnin* με τον μεταγραφικό παράγοντα *CCR4* της ζύμης και την παρουσία του επίτοπου όμοιου με φερμουάρ λευκίνης υποδείκνυαν πως και η *Nocturnin* μπορεί να έχει λειτουργία ως ρυθμιστής της μεταγραφής [34, 35]. Ταυτοποιήθηκε ως ένα ειδικό mRNA του φωτούποδοχέα, το οποίο ελέγχεται μεταγραφικά από το κιρκάδιο ρολόι του αμφιβληστροειδούς. Αυτό το μήνυμα περιέχει ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (*ORF*), το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη η οποία ονομάστηκε *Nocturnin* λόγω των υψηλών επιπέδων έκφρασης κατά τη διάρκεια της νύχτας [34]. Όταν ταυτοποιήθηκε, η αλληλουχία της *Nocturnin* από το *Xenopus laevis* και η ορθόλογή της από τον ποντικό, ήταν καινοφανής. Βιοχημικές δοκιμασίες, πρώτα στο *Xenopus* και έπειτα στον ποντικό, έδειξαν πως η *Nocturnin* είναι μια εξωριβονουκλεάση της οποίας η δραστηριότητα εξαρτάται από το Mg^{2+} , με εξειδίκευση σε εκτάσεις πολυ(A) νουκεοτιδίων, αποδίδοντας έτσι τη δράση της απαδενυλάσης στη *Nocturnin* [33]. Ανατομικά, η *Nocturnin* παράγεται στα φωτοδεκτικά κύτταρα (ραβδία και κονία) του αμφιβληστροειδούς. Υποκυτταρικά εντοπίζεται στο κυταρόπλασμα [35].



Εικόνα 7. Σύγκριση της πρωτεϊνικής έκφρασης της *Nocturnin* και της πολύ(A) εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης (PARN) στον αμφιβληστροειδή του *Xenopus laevis*. Ανοσοσύτωση 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 [36]

³ Διαφορική απεικόνιση: η τεχνική κατά την οποία ο ερευνητής συγκρίνει και ταυτοποιεί αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση σε επίπεδο mRNA μεταξύ ενός ζεύγους ή περισσότερων ευκαρυωτικών κυτταρικών δειγμάτων [32] Liang P. A decade of differential display. *BioTechniques* 2002;33:338-44, 46.

Επιπλέον της κirkάδιας ρύθμισής της, η έκφραση της *Nocturnin* μπορεί να ρυθμιστεί ισχυρά από εξωκυτταρικά σήματα και υπονοεί ότι μπορεί να αποκριθεί άμεσα και εξειδικευμένα σε φυσιολογικές συνθήκες. Η *Nocturnin*, λοιπόν, ως γονίδιο άμεσης απόκρισης⁴ μπορεί και δρα με την ιδιότητα απαδενυλάσης καταστέλλοντας την έκφραση γονιδίων όταν απαιτείται να αποσιωπηθούν ως απόκριση σε αυτά τα εξωκυτταρικά σήματα [37] όπως, σε σοκ στέρσης ορού, παρουσία φορβολικού εστέρα, λιποπολυσακχαρίτη και ροζιλιταζόνης, έναν αγωνιστή του γ υποδοχέα που ενεργοποιείται από το υπεροξεισώματα (PPARγ) [38]. Οι στόχοι της *Nocturnin* δεν έχουν ταυτοποιηθεί ακόμη διότι, δεν διαθέτει επίτοπο πρόσδεσης RNA εκτός της καταλυτικής εσοχής και, ως εκ τούτου, αλληλεπιδρά με τους στόχους της παροδικά, καθιστά έτσι δύσκολη την ταυτοποίησή τους. Αυτό, δεν αποκλείει το ενδεχόμενο, η *Nocturnin* να ρυθμίζει το μήκος της ουράς με έμμεσο μηχανισμό, ή μέσω μιας καινοφανούς δραστηριότητας. Είναι επίσης πιθανό, ότι η *Nocturnin*, συναγωνίζεται κάποια άλλη δραστηριότητα απαδενυλάσης με ρυθμικό τρόπο [38].

Επιπρόσθετα, ποντικοί στους οποίους απουσιάζει η *Nocturnin* (*Noc KO*) έχουν χαμηλό σωματικό βάρος, παρά την παρουσία λιπαρών στην τροφή τους, και μειωμένο κοιλιακό λίπος. Παρόλα αυτά, δεν είναι γνωστό εάν η δράση απαδενυλάσης της *Nocturnin* συνεισφέρει σε αυτό το φαινόμενο, και ποια συγκεκριμένα μετάγραφα στοχεύει για τη δράση της ως απαδενυλάση. Τα μετάγραφα των οποίων η μετάφραση ρυθμίζεται από την *Nocturnin* εμπλέκονται στις λειτουργίες των ριβοσωμάτων και στην οξειδωτική φωσφορυλίωση [38].

Η *Nocturnin* εμπλέκεται σε διαδικασίες πέρα από τη βράχυνση της πολυ(A) 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 μέλη στο ευρύτερο πλαίσιο του δικτύου της γονιδιακής έκφρασης του κυττάρου. Η *Nocturnin* δεν αποτελεί μόνο ένα ένζυμο κλειδί στον κirkάδιο 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 κirkάδιο γονίδιο, ένα γονίδιο δηλαδή, του οποίου η έκφραση καθοδηγείται από το κirkάδιο ρολόι, και αυτό το πρότυπο ρυθμικής έκφρασης τη διαφοροποιούν από τις άλλες απαδενυλάσεις [39].

⁴ Γονίδιο άμεσης απόκρισης: γονίδια τα οποία εμπλέκονται στο πρώτο στάδιο της κυτταρικής απόκρισης σε κάποιο ερέθισμα [37] Garbarino-Pico E, Niu S, Rollag MD, Strayer CA, Besharse JC, Green CB. Immediate early response of the circadian polyA ribonuclease nocturnin to two extracellular stimuli. *Rna* 2007;13:745-55.

1.2.5 Η HESPERIN από το φυτό *Arabidopsis thaliana*

Παρότι το φυτό *Arabidopsis thaliana* ενδέχεται να έχει έως και 26 απαδενυλάσες, η απαδενυλίωση στα φυτά δεν έχει μελετηθεί σε βάθος. Η *AtHESP*, είναι ένα ομόλογο της *Nocturnin* στο *Arabidopsis*, η οποία εμφανίζει μέγιστα επίπεδα έκφρασης το απόγευμα (βλ. Εικόνα 10), και λόγω του προτύπου έκφρασής της πήρε το όνομά της από τον Έσπερο, το πρώτο άστρο του ουρανού πριν τη νύχτα [40]. 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 [41].

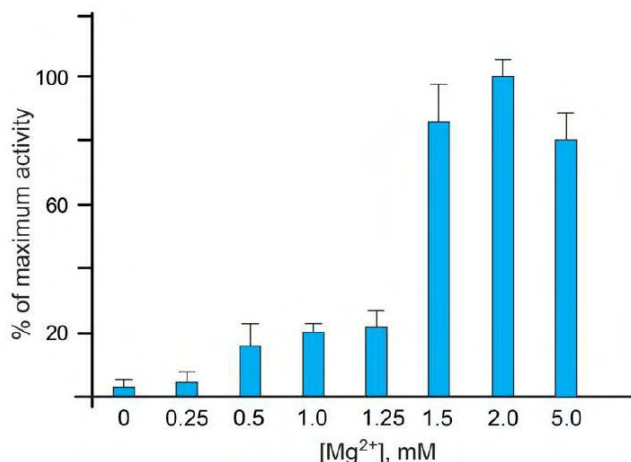
Η *AtHESPERIN* είναι μια 3'-εξωριβονουκλεάση με δράση απαδενυλάσης, δηλαδή έχει την ικανότητα να αφαιρεί την πολυ(A) ουρά από τα mRNA. Η *AtHESP* ταυτοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο *TBLASTN* από τη βάση δεδομένων *TAIR*⁵ (βλ. Εικόνα 8). Η *AtHESP* αποτελεί την πρώτη απαδενυλάση που χαρακτηρίστηκε ότι ρυθμίζεται από τον κirkάδιο ρυθμό [40]. Πρόκειται για ένα αλλοστερικό ένζυμο και ανήκει στις νουκλεάσες που εξαρτώνται από μαγνήσιο. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το γονίδιο *AtHesp* ελέγχεται από τον κirkάδιο 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 10) [40]. 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.

HESP (At1G31500)	FESV	EGVDIG	SRNKS	SDGFFA	IPLYLSKLV	(068)	ADFF	CLQEV	D(145)	GDFNS	IFGDM	(316)	--TLDY	IFIS	(371)	HHPS	DHLPI																																																	
HsNOC	ELLE	ECRA-V	LHTR	PPRFQR	DFV	DLRTDCP	(138)	PDIL	CLQEV	D(197)	GDFNA	EPT	EE(332)	RHTLDY	IWYS	(382)	NYPS	DHLSL																																																
MmNOC	ELLE	ECRA-V	LHTR	PPRYQR	DFV	DLRTDCS	(135)	PDIL	CLQEV	D(195)	GDFNA	EPT	EE(330)	RHTLDY	IWYS	(380)	NYPS	DHLSL																																																
RnNOC	ELLE	ECRA-V	LHTR	PPRYQR	DFV	DLRTDCS	(134)	PDIL	CLQEV	D(194)	GDFNA	EPT	EE(329)	RHTLDY	IWYS	(379)	HYPS	DHLSL																																																
XINOC	ELL	DE	CQV-A	LQDR	PARLHR	DF	F	SLR	SESS	(093)	PDV	LC	QEV	D(154)	GDFNA	ADP	TEE(289)	CHTLDY	IWYS(339)	NYPS	DHLSL																																													
HsCNOT6L (NP_653172)	ELG	R	L	F	Q	L	Q	T	L	G	L	K	G	N	P	L	S	Q	D	I	L	N	L	Y	Q	D	P	(149)	AD	I	I	S	L	Q	E	V	E(242)	AD	L	N	S	L	P	D	S	G(418)	--	V	I	D	Y	I	F	Y	S(494)	H	I	P	S	D	H	F	S	L		
HsCNOT6 (NP_056270)	ELG	K	L	F	Q	L	Q	T	L	G	L	K	G	N	P	L	T	Q	D	I	L	N	L	Y	Q	D	P	(144)	AD	I	V	S	L	Q	E	V	E(242)	AD	L	N	S	L	P	D	S	G(420)	--	I	I	D	Y	I	F	Y	S(496)	L	I	P	S	D	H	F	S	L		
Pt (XP_002304397.1)	F	I	S	V	E	G	D	D	I	Y	S	R	S	K	P	D	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	(029)	T	D	F	L	C	L	Q	E	L	D(085)	G	D	F	N	S	I	F	G	D	K(254)	--	T	L	D	Y	I	F	F	V(310)	Y	H	P	S	D	H	L	P	I
RcNGL1	F	I	P	V	Q	A	P	H	V	F	S	T	T	K	P	D	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	(103)	A	D	F	L	C	L	Q	E	V	D(159)	G	D	F	N	S	I	F	G	D	K(341)	--	T	L	D	Y	I	F	F	S(397)	Y	H	P	S	D	H	L	P	I
HsCCR4 (AF183961)	ELLE	ECRA-V	LHTR	PPRFQR	DFV	DLRTDCP	(137)	PDIL	CLQEV	D(197)	GDFNA	EPT	EE(332)	RHTLDY	IWYS	(382)	NYPS	DHLSL																																																
ScCCR4	EFG	N	L	C	N	L	Q	F	L	G	V	E	G	N	P	L	E	K	Q	F	L	K	I	L	T	E	K	(450)	S	D	L	L	C	L	Q	E	V	E(558)	G	D	F	N	S	Y	I	N	S	A(721)	--	V	I	D	Y	I	W	F	S(785)	K	F	P	S	D	H	I	P	L

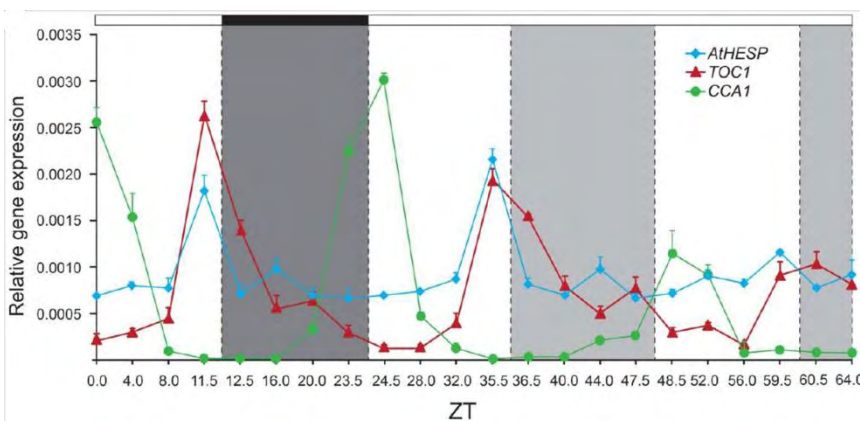
Εικόνα 8. Στοιχισμός της αμινοξικής αλληλουχίας της *AtHesp* με τη *Nocturnin* από διάφορους οργανισμούς (*HsNOC*, *MmNOC*, *RnNOC* and *XINOC*), με ορθόλογες απαδενυλάσες της οικογένειας *EEP* (*HsCNOT6*, *HsCNOT6L* and *ScCCR4*) και με φυτικά ορθόλογα τις *RcNGL1* και *PtEEP*. Η μαύρη γραμμή υποδεικνύει 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 πολύγο-

⁵ Η *TAIR* (The Arabidopsis Information Resource) είναι μια βάση δεδομένων όπου διατηρούνται γενετικά δεδομένα και δεδομένα μοριακής βιολογίας για το ανώτερο φυτό μοντέλο *Arabidopsis thaliana*. Στα διαθέσιμα δεδομένα από την *TAIR* περιέχονται η πλήρης γενωμική αλληλουχία καθώς και γονιδιακή δομή, πληροφορίες σχετικά με τα γονιδιακά προϊόντα, τη γονιδιακή έκφραση, το DNA και τους σπόρους, γονιδιακούς χάρτες γενετικούς και φυσικούς χάρτες δημοσιεύσεις και πληροφορίες σχετικά με την κοινότητα έρευνας στο *Arabidopsis* (πηγή: <http://www.arabidopsis.org/Blast/index.jsp>)

νο). 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 [40].



Εικόνα 9. Η δραστηριότητα της *AtHESP* εξαρτάται από ιόντα *Mg(II)*. Οι ταχύτητες απουσία (0mM) *Mg(II)* ή παρουσία περίσσειας (5mM) *Mg(II)* συγκρίθηκαν με την ταχύτητα της αντίδρασης με συγκέντρωση *Mg(II)* που εμφάνισε τη μέγιστη δραστηριότητα (2mM). Στο γράφημα βλέπουμε μέση τιμή τριών ανεξάρτητων πειραμάτων [40].



Εικόνα 10. Η ημερονύκτια χρονική εξέλιξη της έκφρασης της *AtHesP*, του *TOC1* και του *CCA1* σε φυτά *Arabidopsis thaliana* που αναπτύχθηκαν σε κύκλο 12h φως/12h σκοτάδι. Το γκρι χρώμα δείχνει τις περιόδους σκοταδιού. Η σχετική γονιδιακή έκφραση μετρήθηκε ανάλογα με το εσωτερικό γονιδιακό μετάγραφο του γονιδίου της ουβικιτίνης, το οποίο εμφανίζει ιδιόσυστατη έκφραση. Οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν στο μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων [40].

2 ΣΚΟΠΟΣ

Έχοντας κατανοήσει τη βιοχημική σημασία των ενζύμων που καταλύουν την αντίδραση της απαδενυλίωσης και τον ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο που έχουν στη ρύθμιση του κερκάδιου ρολογιού, έγινε η προσπάθεια του βιοχημικού χαρακτηρισμού του ενζύμου *AtHESP*, που αποτελεί μια απαδενυλάση που υπόκειται σε κερκάδια ρύθμιση. Σκοπός της εργασίας είναι η βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου καθαρισμού της *AtHESP*, η διερεύνηση της δομής του ενζύμου καθώς και ο χαρακτηρισμός των απαραίτητων για την κατάλυση αμινοξέων του ενζύμου μέσω ειδικών κατά θέση μεταλλάξεων των αμινοξέων του ενεργού κέντρου του ενζύμου.

2.1 Πειραματική προσέγγιση

Πρώτος στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου απομόνωσης της πρωτεΐνης με απώτερο σκοπό την απόκτηση κρυστάλλων. Για την απόκτηση κρυστάλλων πρωτεΐνης απαιτείται μεγάλη συγκέντρωση πρωτεΐνης καθαρότητας >90%. Έχοντας αντιμετωπίσει προβλήματα με τη σταθερότητα της πρωτεΐνης ξεκίνησε η διαδικασία υποκλωνοποίησης του τμήματος σε φορέα έκφρασης που έφερε διαφορετική και τμήσιμη ετικέτα αγκιστείας. Παράλληλα, επιχειρήθηκε η αντικατάσταση της αλληλουχίας αναγνώρισης της θρομβίνης από τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης που ήταν ήδη κλωνοποιημένο το cDNA της πρωτεΐνης προς μελέτη, με μια άλλη πρωτεύση, με στόχο την μεγαλύτερη απόδοση καθαρής πρωτεΐνης χωρίς ετικέτα αγκιστείας.

Συνεχίζοντας, με στόχο τον πλήρη βιοχημικό χαρακτηρισμό της πρωτεΐνης προς μελέτη, πραγματοποιήθηκε στοχευμένη μετάλλαξη συγκεκριμένων καταλοίπων του ενζύμου, τα οποία φαίνεται να έχουν καταλυτικό ρόλο βάσει ομολογίας με ήδη χαρακτηρισμένες ορθόλογες πρωτεΐνες. Στις πρωτεΐνες όπου δημιουργήθηκε η μετάλλαξη έγιναν κινητικές μελέτες με σκοπό την εξέταση της ενζυμικής δραστηριότητας ώστε να διαπιστωθεί ο πραγματικός χαρακτήρας των αμινοξέων αυτών ως καταλυτικών ή όχι. Τελος, συνδυάζοντας τα αποτελέσματα των κινητικών μελετών, όπου καταδεικνύεται κινητική συμπεριφορά αλλοστερικού ενζύμου, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδι-ατακτικές συνθήκες (Native-PAGE) ώστε να διευκρινιστεί ο αριθμός των υπομονάδων από τις οποίες απαρτίζεται το ένζυμο.

3 ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

3.1.1 Αντιδραστήρια

Acetic Acid	Merck
Acrylamide	SERVA
Ammonium Persulfate (APS)	SIGMA
Ampicillin	SERVA
N'N' methylene- bis Acrylamide	SERVA
Bovine Serum Albumin (BSA)	New England Biolabs
Bradford protein assay 5x	Bio-rad
Bromophenol Blue	Research Organics
Calcium Chloride dehydrate	Merck
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka
DEPC (Diethylpyrocarbonate)	Serva
Dithiothreitol (DTT)	Applichem
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	Merck
Ethanol Absolute	SIGMA
Formaldehyde	Applichem
Glycerol	Applichem
Glycine	SERVA
Hydrochloric Acid (HCl)	Merck
Imidazole	SIGMA
Isopropanol	Scharlau
Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	Serva
LB Agar	SIGMA
LB Broth	Applichem
Magnesium Chloride Hexahydrate (MgCl ₂ •6H ₂ O)	Panreac
Methanol	Applichem
Methylene Blue Solution	Merck
MOPS [3-(N-morpholino)propanesulfonic acid]	SIGMA
Polyadenylic acid	SIGMA
Pink prestained protein marker	Nippon Genetics
PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride)	Applichem
Potassium Chloride (KCl)	Merck
Potassium Hydroxide (KOH)	Merck
SDS (Sodium dodecyl Sulfate)	SERVA
Silver Nitrate (AgNO ₃)	Panreac
Sodium Bicarbonate (NaHCO ₃)	Merck
Sodium Carbonate Anhydrous (Na ₂ CO ₃)	Panreac
Sodium Chloride (NaCl)	Applichem
Sodium diHydrogen Phosphate	Merck
Sodium Hydrogen Phosphate	Merck
Sodium Hydroxide (NaOH)	Merck
Sodium Thiosulfate pentahydrate (Na ₂ S ₂ O ₃)	ChemLab
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)	Invitrogen
Tris Base	Applichem
Agarose	SIGMA
β- Mercaptoethanol	Riedel de Haën

3.1.2 Βακτηριακά στελέχη

3.1.2.1 Βακτηριακά στελέχη για υπερέκφραση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης

BL21- Gold (DE3)
Rosetta 2
B834 (DE3)

Agilent Technologies
Novagen
Novagen

Τα συγκεκριμένα στελέχη της *E.coli* χρησιμοποιήθηκαν για έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Ιδανικά για το σκοπό αυτό τα καθιστούν η απουσία των *Lon* και *OmpT* πρωτεασών [42]. Επιπλέον, επιτρέπουν την έκφραση ευκαρυωτικών πρωτεϊνών καθώς περιέχουν επιπλέον κωδικόνια τα οποία σπανίως χρησιμοποιούνται από την *E.coli*. Το στέλεχος *Rosetta 2* περιέχει το πλασμίδιο 7 επιπλέον κωδικονίων *pRARE2* [43].

3.1.2.2 Βακτηριακά στελέχη για κλωνοποίηση και υπερέκφραση πλασμιδίου

XL1-Blue

Agilent Technologies

Αυτό το στέλεχος είναι γενετικά τροποποιημένο ώστε να είναι πολύ αποτελεσματικό στο μετασχηματισμό και την αναπαραγωγή πλασμιδιακών φορέων.

3.1.3 Πλασμιδιακοί φορείς

pATHRA
pET-15b
pGEX-6p-1
pUC18

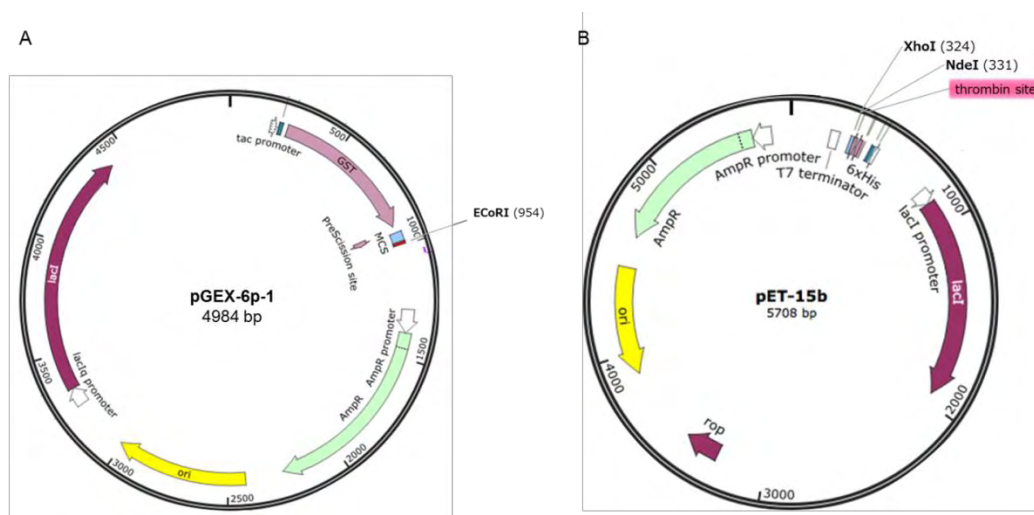
Εργ. Δομικής & Λειτουργικής Βιοχημείας
GE Healthcare
Agilent Technologies

Τα πλασμίδια είναι δίκλινα και συνήθως κυκλικά μόρια DNA, ξεχωριστά από το χρωμοσωμικό DNA, που μπορούν να αντιγράφονται αυτόνομα σε κατάλληλους ξενιστές. Τα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται στη γενετική μηχανική ονομάζονται φορείς (*vectors*) και χρησιμοποιούνται για να πολλαπλασιάζουν ή να εκφράζουν συγκεκριμένα γονίδια και είναι εμπορικά διαθέσιμα από διάφορους κατασκευαστές. Το γονίδιο ενδιαφέροντος κλωνοποιείται σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα που φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό. Συγκεκριμένα, το γονίδιο εισάγεται σε ειδική περιοχή του φορέα, το λεγόμενο πολυσυνδέτη (*multiple cloning site, MCS*), η οποία είναι μια μικρή περιοχή που περιέχει αρκετές κοινώς χρησιμοποιούμενες περιοριστικές θέσεις επιτρέποντας την εύκολη εισαγωγή ενός κομματιού DNA μετά από πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

Το πλασμίδιο για έκφραση πρωτεΐνης συζευγμένης με έξι ιστιδίνες (His Tag) που φέρει αλληλουχία αναγνώρισης για την πρωτεάση 3C, ήτοι *pATHRA* είναι υλική και πνευματική ιδιοκτησία του

εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. Το πλασμίδιο για έκφραση πρωτεϊνών συζευγμένων με την S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST), ήταν προσφορά της Δρ. Καλλιόπης Παπαδοπούλου. Το πλασμίδιο που φέρει τη νουκλεοτιδική αλληλουχία της πρωτεΐνης σε σύντηξη με την S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης, ήτοι *pGEX-6p-1-AtHesp* (ή χάριν συντομίας *pGEX-Hesp*) κατασκευάστηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας (για λεπτομέρειες βλέπε 3.2.1). Τα πλασμίδια που φέρουν τη νουκλεοτιδική αλληλουχία της πρωτεΐνης προς μελέτη ήτοι *pET15b-AtHesp*, *pET15b-114A* βρίσκονται στο φορέα *pET15b*, τα πλασμίδια *pATHRA-AtHesp*, *pATHRA-E114A*, *pATHRA-D287A*, *pATHRA-D346A* και *pATHRA-H385A* βρίσκονται στο φορέα *pATHRA* και είναι όλα ιδιοκτησία του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας.

Στο σχήμα που ακολουθεί φαίνονται οι πλασμιδιακοί χάρτες όλων των χρησιμοποιούμενων φορέων έκφρασης για έκφραση του cDNA και παραγωγή της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος από ανασυνδυασμένα βακτήρια.



Σχήμα 2. Χάρτες πλασμιδιακών φορέων που χρησιμοποιήθηκαν. Α. Ο πλασμιδιακός φορέας *pGEX-6p-1* οδηγεί στην παραγωγή πρωτεϊνών συζευγμένων με την S-Τρανσφεράση της γλουταθειόνης στο αμινοτελικό άκρο τους, **Β.** Ο πλασμιδιακός φορέας *pET15b* οδηγεί στην παραγωγή πρωτεϊνών με 6 ιστιδίνες στο αμινοτελικό τους άκρο (*His-Tag*).

- **pGEX-6p-1:** Οι φορείς *pGEX* είναι διαθέσιμοι από την *GE Healthcare* και χρησιμοποιούνται για έκφραση διαλυτών πολυπεπτιδίων συζευγμένων με την S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) με υψηλή απόδοση σε στελέχη *E.coli*. Οι πρωτεΐνες που είναι συζευγμένες με GST απομονώνονται εύκολα με τη χρήση συμπλέγματος σεφαρόζης 4B με γλουταθειόνη. Η GST αποκόπτεται από την πρωτεΐνη προς μελέτη μέσω της ύπαρξης της αλληλουχίας αναγνώρισης μιας εξειδικευμένης πρωτεάσης μεταξύ της GST και του ανασυνδυασμένου πεπτιδίου. Ο φορέας περιέχει έναν προαγωγέα *tac* ώστε να είναι δυνατή η χημική επαγωγή με μεγάλη α-

πόδοση της έκφρασης και παραγωγή της πρωτεΐνης προς μελέτη. Επίσης, διαθέτει ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (*open reading frame, ORF*) για την κωδικοποίηση της *GST* που ακολουθείται από την περιοχή του πολυσυνδέτη. Τέλος, ο φορέας φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη για επιλογή σε καλλιέργειες στελεχών *E. coli* [44].

- **pET-15b:** Το σύστημα *pET* έχει σχεδιαστεί για την κλωνοποίηση και έκφραση ανασυνδυασμένων γονιδίων σε κύτταρα του στελέχους *E.coli*, με αποτέλεσμα, όταν ενεργοποιηθεί, να είναι δυνατή η γρήγορη παραγωγή μεγάλης ποσότητας οποιασδήποτε επιθυμητής πρωτεΐνης. Η περιοχή του πολυσυνδέτη του *pET15b* βρίσκεται καθοδικά της περιοχής που κωδικοποιεί για την ουρά ιστιδινών, δηλαδή μια αλληλουχία που οδηγεί στην παραγωγή έξι διαδοχικών καταλοίπων ιστιδίνης (*His-tag*). Λόγω της παρουσίας αυτής της διακριτής ουράς στο αμινοτελικό άκτο της πρωτεΐνης προς μελέτη καθίσταται εύκολος ο καθαρισμός μέσω χρωματογραφίας αγκιστείας όπου στη ρητίνη βρίσκονται ακινητοποιημένα ιόντα Ni^{+2} . Ο *pET15b* περιέχει αλληλουχία αναγνώρισης της θρομβίνης, με σκοπό την απομάκρυνση της ουράς ιστιδινών από την πρωτεΐνη προς μελέτη. Ο φορέας, επίσης, φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη για επιλογή σε καλλιέργειες στελεχών *E. coli*.
- **pATHRA:** Ο φορέας αυτός, συνδυάζει όλα τα χαρακτηριστικά του κλασικού *pET15b* με το επιπλέον χαρακτηριστικό πως έχει γίνει αντικατάσταση της αλληλουχίας αναγνώρισης για τη θρομβίνη από την αλληλουχία αναγνώρισης για την πρωτεάση 3C. Αντικαταστάθηκε η θέση αναγνώρισης της θρομβίνης, λόγω της χαμηλής εξειδίκευσης που παρουσιάζει η πρωτεάση αυτή (λόγω ευρέος φάσματος υποστρωμάτων). Αντίθετα, η πρωτεάση 3C εμφανίζει υψηλότερη εξειδίκευση και έχει καλά χαρακτηρισμένες συνθήκες αντίδρασης [45-48].

3.1.4 Ένζυμα

Benzonase
BsaI
Dpn1
EcoRI
RNase inhibitor
KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit

Merck- Millipore
NEB
TaKaRa
TaKaRa
Invitrogen
Kapa

3.1.5 Δείκτες Μοριακών Βαρών

GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder
PiNK prestained protein marker
Kit for Molecular Weights 14,000–500,000 Non-denaturing PAGE

Fermentas
Nippon Genetics
SIGMA-ALDRICH

3.1.6 Υγρή Χρωματογραφία

Protino® GST 4B Agarose
 GST 4B Sepharose beads
 HisTrap HP (Ni²⁺-Sepharose)
 Minisart (0.45µm)
 Minisart (0.22µm)
 Tricorn Superpose 12 10/300 GL
 Vivaspin turbo 4 (10000 cutoff)
 Μεμβράνη διαπίδωσης (10000 cutoff)

Macherey Nagel
 GE Healthcare
 GE Healthcare
 Sartorius stedim
 Sartorius stedim
 GE Healthcare
 Sartorius stedim
 SIGMA

3.1.7 Διαλύματα

3.1.7.1 Ρυθμιστικά διαλύματα λύσης βακτηριακών κυττάρων με χρήση υπερήχων

- Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 1: 0.1M Sodium Phosphate buffer (pH 6), 0.5M NaCl, 0.1% Triton-X, 10% Glycerol, 5mM MgCl₂, 0.1% Monothioglycerol (MTG), 1mM PMSF, lysozyme ίχνη, διαλύονται σε dH₂O. Η προσθήκη της θειογλυκερόλης (MTG), 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 [14].
- Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 2: 0.1M Sodium Phosphate buffer (pH 6), 0.2M NaCl
- Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 3: Πανομοιότυπο με το ρυθμιστικό διάλυμα 1, με την τροποποίηση πως το ρυθμιστικό διάλυμα αποτελείται από 0,1M Tris και η τιμή του pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 8.
- Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 4: Πανομοιότυπο με το ρυθμιστικό διάλυμα 2, με την τροποποίηση πως το ρυθμιστικό διάλυμα αποτελείται από 0,1M Tris και η τιμή του pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 8.

3.1.7.2 Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών (ενδεικτικά 100mM)

12mM Na₂HPO₄, 88mM NaH₂PO₄ (ρύθμιση έως pH 6)

3.1.7.3 Ρυθμιστικά διαλύματα Υγρής Χρωματογραφίας

- Χρωματογραφία Συγγένειας (Ni²⁺ Sepharose, GE Healthcare)

- Ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης: 100mM Phosphate Buffer, 200mM Imidazole, 500mM NaCl, ρύθμιση έως pH 6.0
- Ρυθμιστικό Διάλυμα έκλουσης: 100mM Phosphate Buffer, 700mM Imidazole, 500mM NaCl, ρύθμιση έως pH 6.0
- Χρωματογραφία Συγγένειας (GST 4B, Protino)
 - Ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης: 100mM Phosphate Buffer, 200mM NaCl, 10% Glycerol, ρύθμιση έως pH 6
 - Ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης: 100mM Phosphate Buffer, 200mM NaCl, 10% Glycerol, 20mM ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) ρύθμιση έως pH 6
- Χρωματογραφικός καθαρισμός μεσαίας κλίμακας (GST 4B medium, GE Healthcare)
 - Ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης: 100mM Phosphate Buffer, 200mM NaCl, 10% Glycerol, ρύθμιση έως pH 6
 - Ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης: 100mM Phosphate Buffer, 200mM NaCl, 10mM ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), 10% Glycerol, ρύθμιση έως pH 6
- Χρωματογραφία Μοριακής Διήθησης (Gel Filtration, Tricorn Superose 12)
 - 100mM Phosphate Buffer, 0.5M NaCl, ρύθμιση έως pH 6.0

3.1.7.4 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 dH₂O. Στο διάλυμα προστίθεται και SDS σε τελική αναλογία 0,1% [49]. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

3.1.7.5 Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων SDS-PAGE 4× (Sample Buffer)
500mM 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 βρομοφαι-

νόλης προστίθεται ώστε να είναι δυνατή η παρατήρηση του μετώπου της ηλεκτροφόρησης, καθώς έχει ταχύτερη ηλεκτροφορητική κινητικότητα από τις ηλεκτροφορούμενες πρωτεΐνες [50].

3.1.7.6 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.

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

40% Glycerol, 250mM Tris-HCl pH 6.8, 0.015% Bromophenol blue, dH₂O.

3.1.7.8 1% Bromophenol Blue

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

3.1.7.9 Διαλύματα χρώσης πηκτών ακρυλαμίδιου

3.1.7.9.1 Χρώση με Coomassie

10% Acetic Acid, Coomassie Blue 0.05% (40% Methanol, 10% Acetic Acid, dH₂O, 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.

3.1.7.9.2 Χρώση με Νιτρικό άργυρο (AgNO₃)

- **Fixation:** 50% Methanol, 5% Acetic Acid, dH₂O. Στο βήμα της μονιμοποίησης, τα μακρομόρια γίνονται αδιάλυτα λόγω της παρουσίας του οξέος, 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% Na₂S₂O₃. 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 (S₂O₃²⁻) 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.

- AgNO₃: 0.1% AgNO₃.
- Development: 2% Na₂CO₃, 0.04% Formaldehyde, dH₂O. 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 οξειδωση του αργύρου, λόγω του όξινου χαρακτήρα του διαλύματος.

Όλα τα διαλύματα διατηρούνται σε θερμοκρασία +4°C. Τα διαλύματα για το *development* και το διάλυμα AgNO₃ φυλάσσονται στο σκοτάδι [51, 52].

3.1.7.10 Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 10×

1M Tris, 1M Boric acid, 50mM EDTA. Οι σκόνες διαλύονται σε αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών (MilliQ-DEPC) και το διάλυμα φιλτράρεται σε αποστειρωμένο μπουκάλι.

3.1.7.11 Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων RNA 2× (Sample buffer)

95% φορμαμίδιο, 5mM EDTA, 0,025% SDS, 0.025% Xylene cyanol, 0.025% bromophenol blue. Το φορμαμίδιο έχει δειχθεί πως αναστέλλει τη δράση των RNAσών και βοηθά στη διατήρηση του RNA [53]. Η παρουσία του EDTA ως χηλικού παράγοντα εξυπηρετεί τον ίδιο σκοπό με την ιδιότητά του να δεσμεύει δισθενή ιόντα μετάλλων και ιδιαίτερα Mg²⁺. Τα δισθενή ιόντα μετάλλων, είναι απαραίτητα για τη δραστηριότητα πολλών RNAσών και η δέσμευσή τους από το EDTA δρα ανασταλτικά για τα ένζυμα αυτά [54].

3.1.7.12 Διαλύματα βαφής πηκτής πολυακρυλαμίδιου

10% Acetic Acid, Coomassie Blue 0.5% (40% Methanol, 10% Acetic Acid, dH₂O, 0.1% Coomassie Blue R-250). 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.

3.1.7.13 Διαλύματα για τη μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της AtHesperin

- Νερό ελεύθερο νουκλεασών: MilliQ ddH₂O 18.2 mΩ ή νερό για ενέσεις, 0.1% διαίθυλ-πυροανθρακικό εστέρα (DEPC), εξάτμιση του DEPC κατά τη διάρκεια της νύχτας και αποστείρωση για να απομακρυνθεί το DEPC. Φυλάσσεται στο σκοτάδι. Το DEPC χρησιμοποιείται για την αναστολή των RNAσών στο νερό μέσω ομοιοπολικής τροπο-

ποίησης καταλοίπων ιστιδίνης, λυσίνης, κυστεΐνης και τυροσίνης των ενεργών κέντρων των ενζύμων αυτών [55].

- Διάλυμα αντίδρασης: 50mM Phosphate Buffer, 2mM MgCl₂, 100mM NaCl, 0.5mM DTT, 10% glycerol (pH 6.5), η διθειοτρεϊτόλη έχει ως σκοπό τη διατήρηση μιας «χαλαρή» διαμόρφωσης του ενζύμου 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 νουκλεασών. Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι.

3.1.7.14 Ρυθμιστικό διάλυμα για ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης 50×:
24.2% Tris base, 5.71% ακετοξικό οξύ, 0.05M EDTA (pH 8,6)

3.1.7.15 Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων ηλεκτροφόρησης αγαρόζης 6×
0.09% Bromophenol Blue, 0.09% Xylene Cyanol, 60% Γλυκερόλη, 60mM EDTA

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)
Αυτόματες πιπέτες
Θερμοκυκλοποιητής Mastercycler Gradient
Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini PROTEAN® Tetra Cell
Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης ADJ1 Giraffe™
Μετρητής pH
Σύστημα απεικόνισης
Φυγόκεντροι
Φασματοφωτόμετρο ορατού- υπεριώδους UV 1600-PC

GE Healthcare Life Sciences
Gilson, Nichiryo
eppendorf
BioRad
Owl, Thermo Fischer
Metrohm
Protein Simple, Cambridge
eppendorf Centrifuge 5810R
Hermle Z36HK
VWR

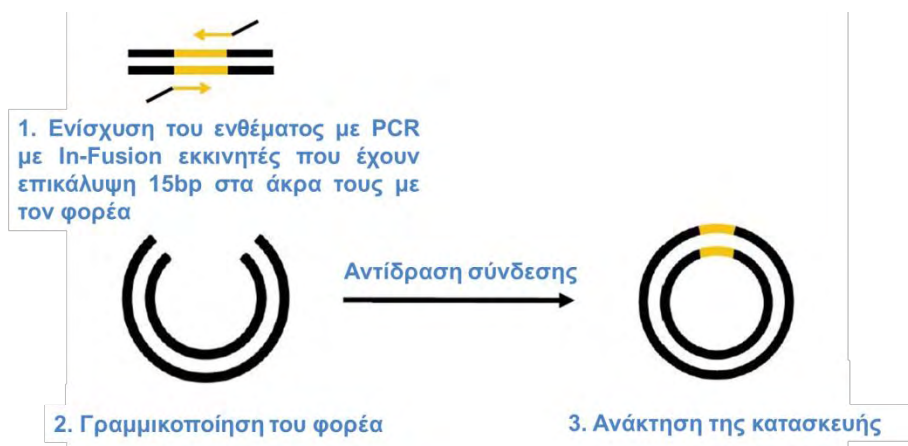
3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Υποκλωνοποίηση cDNA αλληλουχίας της AtHESP με τη μέθοδο In-fusion HD Cloning

Για την υποκλωνοποίηση της AtHESP από τον πλασμιδιακό φορέα pET-15b στο φορέα pGEX-6p-1, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο του In-fusion HD cloning kit. Το πρωτόκολλο αυτό είναι σχεδιασμένο για γρήγορη και κατευθυνόμενη κλωνοποίηση ενός ή περισσότερων τμημάτων DNA σε έναν φορέα. Η τεχνολογία που χρησιμοποιεί το συγκεκριμένο πρωτόκολλο είναι δυνατή η γρήγορη και κατευθυνόμενη κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς, καθώς κάνει χρήση του κατοχυρωμένου από την Clontech ενζύμου In-Fusion, η οποία συνδέει τμήματα DNA μεταξύ τους (όπως είναι ένα προϊόν PCR και ένας γραμμικοποιημένος πλασμιδιακός φορέας) τα οποία έχουν μια αλληλοεπικάλυψη 15bp στα άκρα τους με ακρίβεια και με το σωστό προσανατολισμό. Αυτή η αλληλοεπικάλυψη μπορεί να δημιουργηθεί κατά το σχεδιασμό των εκκινητών για την αντίδραση της PCR [56, 57] (για τον σχεδιασμό των ειδικών εκκινητών, βλ.3.2.1.2).

Τα βήματα που απαιτούνται για την πραγματοποίηση της υποκλωνοποίησης είναι τα εξής (Σχήμα 3):

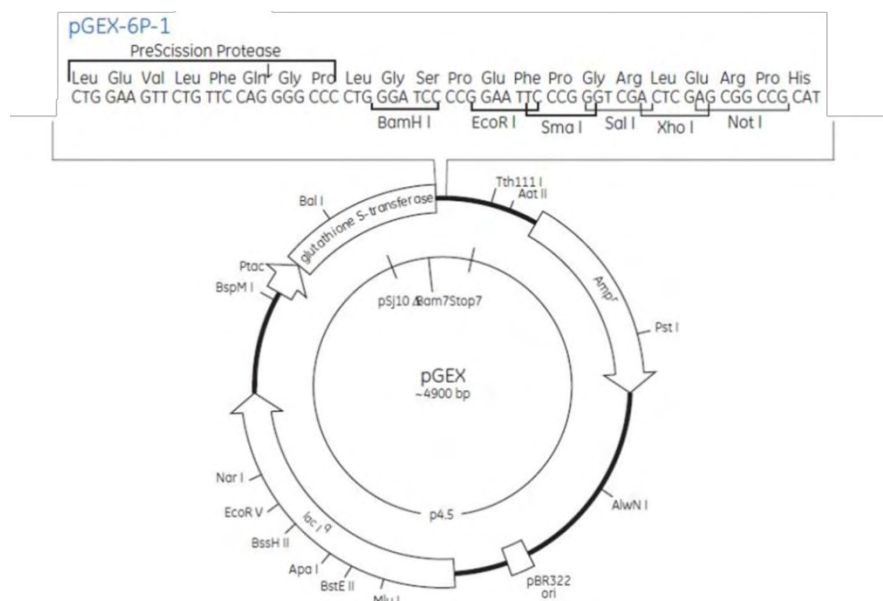
- i. PCR για ενίσχυση του τμήματος που θα κλωνοποιηθεί χρησιμοποιώντας ως μήτρα DNA το cDNA της AtHesp από το πλασμίδιο pET15b με τους ειδικούς In-Fusion εκκινητές
- ii. Πέψη του φορέα (pGEX-6p-1) όπου θα κλωνοποιηθεί το ένθεμα (AtHesp) με ενδονουκλεάση περιορισμού η οποία έχει εξασφαλισθεί πως έχει μόνο μια θέση αναγνώρισης στο φορέα στην περιοχή πολυσυνδέτη, έτσι ώστε ο φορέας να γίνει γραμμικός και όχι να κατακερματιστεί σε περισσότερα τμήματα.
- iii. Ηλεκτροφόρηση των τμημάτων DNA του φορέα και του ενθέματος για την ταυτοποίηση της παρουσίας τους και την ποσοτικοποίησή τους.
- iv. Έκπλυση και ανάκτηση των τμημάτων DNA από την πηκτή αγαρόζης (Gel & PCR clean up kit, Macherey-Nagel)
- v. Αντίδραση επίδεσης του ενθέματος στον πλασμιδιακό φορέα (Ligation) με τη χρήση του In-Fusion ενζύμου
- vi. Μετασχηματισμός σε επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα
- vii. Επιλογή μετασχηματισμένων βακτηριακών κλώνων και ταυτοποίηση με αλληλούχηση.



Σχήμα 3. Επισκόπηση της πορείας κλωνοποίησης. Με κίτρινο χρώμα απεικονίζεται το ένθεμα [56].

3.2.1.1 Πέψη με περιοριστικά ένζυμα

Η πέψη του φορέα κλωνοποίησης pGEX-6p-1 έγινε με τη χρήση του περιοριστικού ενζύμου EcoRI, το οποίο αναγνωρίζει μία μοναδική αλληλουχία στην περιοχή πολυσυνδέτη του πλασμιδίου (Σχήμα 4). Τα επιμέρους συστατικά και οι όγκοι της αντίδρασης πέψης, ορίστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πιο συγκεκριμένα, οι όγκοι ορίστηκαν ώστε το υπόστρωμα DNA να έχει ποσότητα $\leq 1\mu\text{g}$ (βλ. ΠΙΝΑΚΑΣ 1). Στη συνέχεια, έγινε επώαση της αντίδρασης στους 37°C για 2 ώρες. Μετά τις 2 ώρες επώασης η αντίδραση περατώθηκε με προσθήκη κατάλληλου όγκου ρυθμιστικού διαλύματος δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης 6x (6x loading buffer), ώστε η τελική συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος να είναι 1x. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης για ποσοτικοποίηση του γραμμικοποιημένου πλέον φορέα.



Σχήμα 4. Απεικόνιση της περιοχής του πολυσυνδέτη του πλασμιδιακού φορέα pGEX-6p-1. Ως PreScission Protease™ αναφέρεται η εμπορικά διαθέσιμη από την GE Healthcare συζευγμένη με GST-3C πρωτεάση. Καθοδικά της αλληλουχίας αναγνώρισης για την PreScission Protease™ διακρίνεται η θέση περιορισμού της EcoRI [58].

ΠΙΝΑΚΑΣ Ι. ΤΑ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΕΨΗΣ ΤΟΥ ΦΟΡΕΑ

EcoRI	1 μL
10x Buffer H	2 μL
pGEX-6p-1	10 μL
ddH ₂ O	7 μL
Υτελ	20 μL

3.2.1.2 Σχεδιασμός ειδικών PCR εκκινήτων και αντίδραση PCR

Με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) είναι δυνατό να ενισχύονται συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA μέσω συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινήτων) και θερμοάντοχων πολυμερασών σε συνθήκες αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης, οι οποίες επαναλαμβάνονται σε κύκλους. Κατά αυτόν τον τρόπο, το προϊόν που ενισχύεται είναι εξειδικευμένο και παράγεται σε μεγάλες ποσότητες.

Ο σχεδιασμός ορθών και ποιοτικών εκκινήτων είναι καθοριστικής σημασίας για την επιτυχία της κλωνοποίησης με το In Fusion HD cloning kit της Clontech. Οι In-Fusion PCR εκκινήτες πρέπει να σχεδιαστούν με τρόπο τέτοιο ώστε να παράγουν προϊόν ενίσχυσης PCR με άκρα ομόλογα με τα άκρα του επιθυμητού φορέα στη γραμμικοποιημένη του μορφή (βλ. 3.2.1.1).

Κάθε In-Fusion εκκινήτης πρέπει να έχει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- Το 5' άκρο κάθε εκκινητή θα πρέπει να περιέχει 15 βάσεις ομόλογες με τις 15 βάσεις στο ένα άκρο του κομματιού DNA στο οποίο πρόκειται να εισαχθεί (δηλαδή στον πλασμιδιακό φορέα).
- Το 3' άκρο κάθε εκκινητή θα πρέπει να περιέχει αλληλουχία ειδική για το γονίδιο στόχο.
- Το 3' τμήμα κάθε εκκινητή θα πρέπει να είναι ειδικό για το γονίδιο στόχο, να έχει GC περιεχόμενο 40-60%, μήκος 18-25 νουκλεοτίδια, Tm 58-65°C (η διαφορά της Tm μεταξύ έμπροσθεν και όπισθεν εκκινητή δεν πρέπει να ξεπερνά τους 4 °C. Η τιμή της Tm πρέπει να υπολογίζεται βάσει της γονίδιο-ειδικής αλληλουχίας του εκκινητή).
- Θα πρέπει να αποφεύγεται η συμπληρωματικότητα εντός του ίδιου εκκινητή, καθώς και μεταξύ των εκκινητών, ώστε να αποφευχθεί η παρεμπόδιση της αντίδρασης από τη δημιουργία δευτεροταγών διαμορφώσεων ή η ενίσχυση διμερών των εκκινητών.
- Οι εκκινητές θα πρέπει να έχουν απομονωθεί με HPLC ή να μην διαθέτουν προσμίξεις αλάτων (salt-free).
- Είναι απαραίτητο να έχει ελεγχθεί η ορθότητα και η εξειδίκευσή τους ως προς το γονίδιο-στόχος.

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

Το cDNA της AtHesp άνευ μεταλλάξεων ενισχύθηκε με PCR, με τη χρήση του KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το πλασμιδιακό DNA pET15b-AtHesp, τους ειδικούς εκκινητές και DNA πολυμεράση υψηλής πιστότητας (βλ. ΠΙΝΑΚΑΣ II). Η εν λόγω DNA πολυμεράση φέρει ένα αντίσωμα, το οποίο αποδεσμεύεται από το ένζυμο όταν υποβληθεί απότομα σε υψηλή θερμοκρασία, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η δράση του ενζύμου πριν ξεκινήσει η αντίδραση PCR, και ως εκ τούτου η δημιουργία μη ειδικών προϊόντων. Οι ειδικοί εκκινητές σχεδιάστηκαν όπως περιγράφηκε παραπάνω και η αλληλουχία τους φαίνεται στον ΠΙΝΑΚΑΣ XVI.

ΠΙΝΑΚΑΣ II. ΤΑ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ PCR

2X KAPA HiFi HotStart Ready Mix	25 µL
Εκκινητής FW 10µM	1,5 µL
Εκκινητής REV 10µM	1,5 µL
Πλασμιδιακό DNA (pET15b-AtHesp)	2 µL
ddH ₂ O	20 µL
ΥΤΕΛ	50 µL

ΠΙΝΑΚΑΣ III. Το θερμικό προτύπο της αντίδρασης PCR. Ο ΧΡΟΝΟΣ ΕΠΕΚΤΑΣΗΣ, ΔΗΛΑΔΗ Ο ΧΡΟΝΟΣ ΠΟΛΥΜΕΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΑΠΟΣΥΝΤΙΘΕΜΕΝΟΥ ΚΛΩΝΟΥ DNA, ΕΞΑΡΤΑΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΜΗΚΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΠΟΥ ΕΝΙΣΧΥΕΤΑΙ. ΓΕΝΙΚΑ, ΙΣΧΥΕΙ ΟΤΙ ΓΙΑ ΚΑΘΕ 1ΚΒ DNA ΠΟΥ ΕΝΙΣΧΥΕΤΑΙ, Ο ΧΡΟΝΟΣ ΕΠΕΚΤΑΣΗΣ ΕΙΝΑΙ ~ 1ΜΙΝ

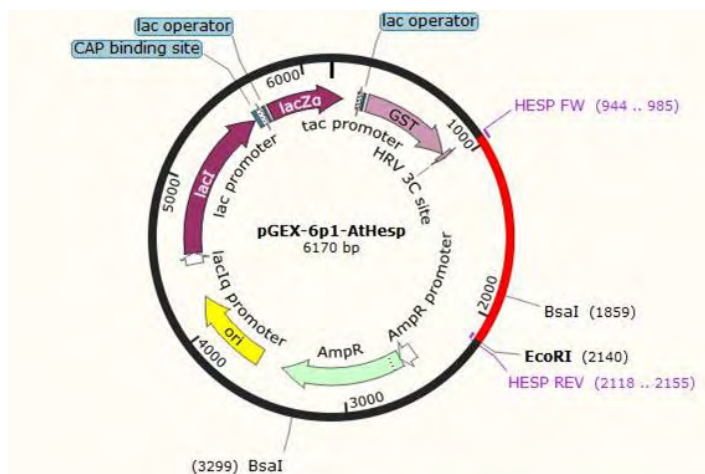
Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95	3 min	24 κύκλοι αντίδρασης
Αποδιάταξη	98	20 sec	
Υβριδοποίηση	65	15 sec	
Επέκταση	72	90 sec	
Τελική επέκταση	72	10 min	

3.2.1.3 Αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού

Στη συγκεκριμένη μεθοδολογία, η διαδικασία επίδεσης του τμήματος του ενθέματος με τον γραμμικοποιημένο φορέα βασίζεται στον ομόλογο ανασυνδυασμό και όχι με αντίδραση λιγάσης. Η αντίδραση καταλύεται από μία ρεκομπινάση που αναγνωρίζει με ακρίβεια και εξειδίκευση τα κοινά άκρα των 15bp που έχουν ο φορέας και το ένθεμα (βλ.3.2.1.2). Η αναλογία της ποσότητας του ενθέματος προς αυτή του φορέα κλωνοποίησης, προκειμένου η απόδοση του ομόλογου ανασυνδυασμού να είναι υψηλή, ορίστηκε ως 3 προς 1 αντίστοιχα (AtHesp DNA: pGEX-6p-1 DNA = 3:1) σύμφωνα με το In-fusion HD cloning kit. Ο λόγος για τον οποίο η ποσότητα του ενθέματος ορίζεται 3 φορές περισσότερη από την ποσότητα του φορέα είναι έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανότητες ο φορέας να επανακυκλοποιηθεί χωρίς να λάβει ένθεμα. Στη συνέχεια, έγινε επώαση της αντίδρασης στους 50 °C για 30min. Μετά τα 30min επώασης, η αντίδραση περατώθηκε με αποθήκευση στον πάγο (0 °C).

ΠΙΝΑΚΑΣ IV. ΤΑ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΚΑΙ ΟΙ ΟΓΚΟΙ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΟΜΟΛΟΓΟΥ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ

pGEX-6p-1 (35ng)	2 μL
AtHesp (100ng)	6 μL
5x In-fusion HD Enzyme	2 μL
ddH ₂ O	-
Υτέλ	10 μL



Σχήμα 5. Χάρτης του φορέα pGEX-6p-1 μετά την κλωνοποίηση του προς εξέταση γονιδίου (AtHesp). Το τμήμα του φορέα που απεικονίζεται με κόκκινο αντιστοιχεί στο τμήμα του cDNA της AtHesp.

3.2.2 Παρασκευή επιδεκτικών προς χημικό μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων

Κάποια βακτηριακά γένη όπως τα *Micrococcus*, *Haemophilus* και *Bacillus* μετασχηματίζονται φυσικά, διότι στην επιφάνεια της μεμβράνης υπάρχουν πρωτεΐνες που προσδένουν άμεσα εξωγενές DNA το οποίο και μεταφέρουν μέσα στο κυτταρόπλασμα. Τέτοιου είδους πρωτεΐνες μεταφοράς δεν έχουν αναφερθεί για την *E. coli* και ως εκ τούτου δε συμβαίνει γενετικός μετασχηματισμός αυθόρμητα σε κύτταρα *E. coli*. Υπάρχουν πρωτεΐνες που σχηματίζουν πόρους (πορίνες) σε υψηλό αριθμό αντιγράφων (περίπου 10^5 μόρια πορίνης ανά κύτταρο) στην εξωτερική κυτταρική μεμβράνη, οι οποίες σχηματίζουν ένα μοριακό ηθμό για την παθητική μεταφορά υδρόφιλων μορίων με μέγιστο μοριακό βάρος έως 5000 Da. Συνεπώς, μακρομόρια όπως το DNA δεν μπορούν να περάσουν το κυτταρικό τοίχωμα της *E. coli* [59].

Η πρόσληψη και ενσωμάτωση εξωγενούς DNA από το περιβάλλον στο βακτηριακό γονιδίωμα ονομάζεται μετασχηματισμός. Τα βακτηριακά κύτταρα που είναι ικανά να προσλάβουν εξωγενές DNA ονομάζονται επιδεκτικά [59, 60]. Η επώαση με Ca^{2+} καθιστά την εξωτερική μεμβράνη της *E. coli* αντιστρεπτά διαπερατή σε μακρομόρια μέσω πλασμόλυσης. Παρουσία του CaCl_2 , αυξάνονται τα επίπεδα των πρωτεϊνών *OmpC*, *OmpA* κ.α. [59] οι οποίες είναι πορίνες και έχουν ωσμωρυθμιστικό ρόλο στους πρωκαρυώτες [59, 61, 62]. Η πλασμόλυση που συμβαίνει παρουσία του CaCl_2 είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού [59, 61].

Από μια καλλιέργεια που έχει μεγαλώσει όλη τη νύχτα (στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση στις 210rpm) σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο και παρουσία του κατάλληλου αντιβιοτικού, εμβολιάζονται σε τελική συγκέντρωση 1/100 σε 200mL αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (210rpm) και παρακολου-

θείται φασματοφωτομετρικά λαμβάνοντας 1mL καλλιέργειας ανά τακτά χρονικά διαστήματα μέχρι να φτάσει να έχει $OD_{600nm} = 0.5-0.7$ A, όπου και θεωρείται πως η καλλιέργεια θα βρίσκεται στο απόγειο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης. Σε αυτό το στάδιο, το σύνολο της καλλιέργειας φυγοκεντρείται σε παγωμένους σωλήνες τύπου falcon των 50mL, στις 4000rpm για 6min στους 4°C και έπειτα τοποθετούνται στον πάγο για 14 λεπτά. Το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε παγωμένο διάλυμα 0.1M $CaCl_2$ και αφήνεται για 20min στον πάγο. Εν συνεχεία, φυγοκεντρείται στις 4000rpm για 6min στους 4°C και επαναδιαλύεται εκ νέου σε παγωμένο διάλυμα 0.1M $CaCl_2$ και αφήνονται στον πάγο για 12-16h. Τέλος, τα βακτήρια αραιώνονται σε γλυκερόλη (10% τελική συγκέντρωση), διαμοιράζονται σε σωλήνες τύπου *erppendorf* σε κλάσματα των 100μL και αποθηκεύονται στους -80°C μετά από ταχεία ψύξη (flash freeze) σε παγωμένη αιθανόλη 100% (-80°C). Σημειώνεται ότι όλοι οι χειρισμοί πλην της επώασης γίνονται ψυχρό θάλαμο (+4°C) και πάγο, με αποστειρωμένα υλικά και εργαλεία σε στείρες συνθήκες.

3.2.3 Μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηρίων με τον επιθυμητό πλασμιδιακό φορέα

Πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli* στελεχών *BL21-Gold* (DE3), *B834*, *Rosetta 2* και *X11-Blue* (βλ.3.1.2) με τη μέθοδο του θερμικού σοκ (heat shock). Στο σωληνάριο τύπου *erppendorf* όπου ήταν αποθηκευμένα τα επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα προστίθενται 50ng ανασυνδυασμένου πλασμιδίου (βλ. 3.1.3), αναδεύονται πολύ ήπια και αφήνονται για επώαση στους 0°C για 30min. Ακολούθως, τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 42°C για 45sec ακριβώς. Στη συνέχεια, μεταφέρονται για επώαση στους 4°C για 2min. Μετά το πέρας των 2 λεπτών, τοποθετείται έως τελικό όγκο 1ml αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο, 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 κατάλληλο αντιβιοτικό, 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.

3.2.4 Πέψη ανασυνδυασμένου φορέα pGEX-6p-1 με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Ο ανασυνδυασμένος φορέας pGEX-6p-1 με το γονίδιο της AtHesp ήτοι, pGEX-Hesp υπέστη πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες BsaI και EcoRI ώστε να διαπιστωθεί η ύπαρξη του ενθέματος, προτού αποσταλούν για αλληλούχηση. Το περιοριστικό ένζυμο BsaI αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-GGTCTCN/NNNNN-3' η οποία βρίσκεται εκτός από μια τυχαία περιοχή στο φορέα, και εντός της αλληλουχίας του γονιδίου της AtHESP. Η περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-G/AATTC-3'. Οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι παλίνδρομες και τα ένζυμα αυτά τέμνουν τον φωσφοδιεστερικό δεσμό του DNA στις θέσεις που υποδεικνύονται (/).

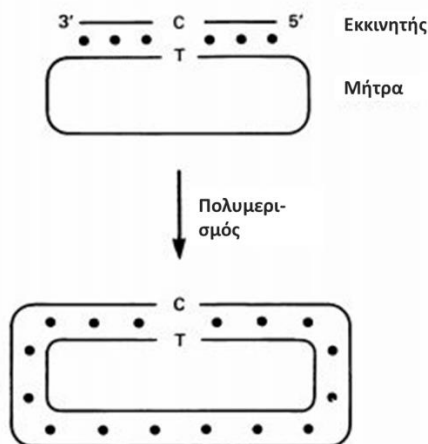
Η αντίδραση (βλ. ΠΙΝΑΚΑΣ V) επώαστηκε στους 37°C για 2 ώρες. Μετά τις 2 ώρες επώασης η αντίδραση περατώθηκε με προσθήκη κατάλληλου όγκου 6x ρυθμιστικού διαλύματος δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης (6x loading buffer) ώστε η τελική συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος να είναι 1x. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και έλεγχος του προτύπου και του μεγέθους των ζωνών.

ΠΙΝΑΚΑΣ V. ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΔΙΠΛΗΣ ΠΕΨΗΣ

pGEX-Hesp	10 μL
10x Buffer H	2 μL
EcoRI (15U)	1 μL
BsaI (10U)	1 μL
ddH ₂ O	6 μL
ΥΤΕΛ	20 μL

3.2.5 Στοχευμένη μεταλλαξιγένεση

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία ενός κλωνοποιημένου τμήματος DNA μπορεί να αλλάξει κατά βούληση μέσω της στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης χρησιμοποιώντας συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια. Η πιο κοινή προσέγγιση είναι να γίνει χρήση ενός ολιγονουκλεοτιδίου συμπληρωματικού προς ένα τμήμα του DNA μήτρα αλλά να εμπεριέχει μια εσωτερική αναντιστοιχία στο σημείο όπου θα δημιουργηθεί η μετάλλαξη (βλ. Σχήμα 6). Εκτός της δημιουργίας μεταλλάξεων ενός νουκλεοτιδίου, αυτή η προσέγγιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την δημιουργία πολλών μεταλλάξεων, ενθέσεων και απαλείψεων [63].



Σχήμα 6. Σχεδιασμός ολιγονουκλεοτιδίου για την ειδαγωγή μετάλλαξης σε συγκεκριμένη θέση.
Προσαρμόστηκε από [63]

3.2.5.1 Εισαγωγή της αλληλουχίας αναγνώρισης της πρωτεάσης 3C στον φορέα pET-15b

Για τη δημιουργία του φορέα pATHRA ο οποίος φέρει σηματοδοτική ετικέτα έξι καταλοίπων ιστιδίνης στο αμινοτελικό άκρο του ενθέματος και επίσης φέρει τη θέση αναγνώρισης της πρωτεάσης 3C μεταξύ της σηματοδοτικής ετικέτας και του ενθέματος χρησιμοποιήθηκε το Primer-X (<http://bioinformatics.org/primerx/>) και ως μήτρα χρησιμοποιήθηκε το φορέας pET-15b (βλ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ, ΠΙΝΑΚΑΣ XVII).

Η αντίδραση της PCR γίνεται σε συνθήκες ευνοϊκότερες από ότι συμβαίνει συνήθως (αυξημένος χρόνος υβριδοποίησης και επέκτασης, χαμηλή θερμοκρασία υβριδοποίησης) καθώς οι εκκινητές έχουν ανόμοια νουκλεοτίδια σε σχέση με το DNA μήτρα (βλ. ΠΙΝΑΚΑΣ VII).

ΠΙΝΑΚΑΣ VI. ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΑΣΗΣ 3C

2X ΚΑΡΑ HiFi HotStart Ready Mix	22 μL
Εκκινητής (10μM) ⁶	1,3 μL
Πλασμιδιακό DNA ⁷	1,5 μL
ddH ₂ O	22,2 μL
Ντελ	50 μL

⁶ Η αντίδραση για τον εμπροσθεν εκκινητή (FW) έγινε ξεχωριστά από την αντίδραση για τον όπισθεν εκκινητή (REV)

⁷ Τα συστατικά της αντίδρασης για την προσθήκη της θέσης αναγνώρισης της πρωτεάσης 3C είναι ίδια και για το φορέα pET-15b που φέρει το ένθεμα της AtHESP και για εκείνον που δε φέρει κάποιο ένθεμα.

ΠΙΝΑΚΑΣ VII. ΤΟ ΘΕΡΜΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ PCR. Ο ΧΡΟΝΟΣ ΕΠΕΚΤΑΣΗΣ, ΔΗΛΑΔΗ Ο ΧΡΟΝΟΣ ΠΟΛΥΜΕΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΑΠΟΣΥΝΤΙΘΕΜΕΝΟΥ ΚΛΩΝΟΥ DNA, ΕΞΑΡΤΑΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΜΗΚΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΠΟΥ ΕΝΙΣΧΥΕΤΑΙ. ΓΕΝΙΚΑ, ΙΣΧΥΕΙ ΟΤΙ ΓΙΑ ΚΑΘΕ 1ΚΒ DNA ΠΟΥ ΕΝΙΣΧΥΕΤΑΙ, Ο ΧΡΟΝΟΣ ΕΠΕΚΤΑΣΗΣ ΕΙΝΑΙ ~ 1ΜΙΝ

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95	3 min	10 κύκλοι αντίδρασης
Αποδιάταξη	98	20 sec	
Υβριδοποίηση	65	1 min	
Επέκταση	72	8 min	

Κατόπιν, οι αντιδράσεις των PCR για τους επιμέρους εκκινήτες (δηλαδή η αντίδραση για τον εμπροσθεν εκκινήτη και η αντίδραση για τον όπισθεν εκκινήτη) ενώθηκαν σε μια αντίδραση η οποία έλαβε χώρα σε ακόμη πιο ευνοϊκές συνθήκες (βλ. ΠΙΝΑΚΑΣ VIII) και προστέθηκε ένα βήμα τελικής επέκτασης.

ΠΙΝΑΚΑΣ VIII. ΤΟ ΘΕΡΜΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ PCR.

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95	3 min	15 κύκλοι αντίδρασης
Αποδιάταξη	98	20 sec	
Υβριδοποίηση	60	1 min	
Επέκταση	72	8 min	
Τελική επέκταση	72	20 min	

Τέλος, για να διαχωρίσουμε στο δείγμα τους κλώνους που περιέχουν τη νέα αλληλουχία που προστέθηκε μέσω των εκκινήτων γίνεται πέψη με το ένζυμο Dpn1. Η Dpn1 κόβει το DNA μόνο εάν η αλληλουχία αναγνώρισης έχει μεθυλιώσεις. Χρησιμοποιείται σε αυτή την περίπτωση για να απαλλάξουμε το δείγμα από το DNA μήτρα, το οποίο είναι μεθυλιωμένο, ενώ το νεοσυντεθέν προϊόν από την αντίδραση της PCR δεν είναι.

ΠΙΝΑΚΑΣ IX. ΤΑ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΕΨΗΣ Μ Ε DPN1

Dpn1	1 µL	37°C/ 5h
10x Buffer 4	5 µL	
Αντίδραση μεταλλαξιγένεσης	44 µL	
Βτελ	50 µL	

Ως αντίδραση μεταλλαξιγένεσης αναφέρεται η αντίδραση PCR για την εισαγωγή των μεταλλάξεων (βλ. Πίνακας VIII).

Εν συνεχεία, το DNA κατακρημνίστηκε με αιθανόλη. Πιο συγκεκριμένα, στο διάλυμα της αντίδρασης προστέθηκε σε τελική συγκέντρωση 0.25M NaCl και κατόπιν 3 όγκοι 100% παγωμένη αιθανόλη. Το δείγμα ανακινήθηκε έντονα (vortex) και καταψύχθηκε (-80°C) για 30min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 15000rpm/4°C/30min και το υπερκείμενο προσεκτικά απορρίφθηκε. Ακολούθως, προ-

στέθηκε 70% παγωμένη αιθανόλη και το δείγμα υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση στις 15000rpm/4°C/5min. Το υπερκείμενο και πάλι απορρίφθηκε και το δείγμα αφέθηκε να στεγνώσει έως ότου εξατμιστήκε η αιθανόλη. Τέλος, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 10μL υπερκάρου ύδατος.

Τέλος, γίνεται εισαγωγή του ανασυνδυασμένου φορέα σε επιδεικτικά βακτήρια (Xl1-Blue) και ακολούθως απομόνωση πλασμιδίου με το kit Nucleo-spin plasmid no-lid (Macherey- Nagel). Τα πλασμιδία που συλλέχθηκαν αποστέλλονται για αλληλούχηση.

3.2.5.2 Εισαγωγή μεταλλάξεων στην AtHESP

Δημιουργήθηκαν τέσσερις μονές μεταλλάξεις με τη μέθοδο που περιγράφηκε παραπάνω. Πιο συγκεκριμένα, η AtHESP, θεωρείται πως ανήκει στην οικογένεια ενζύμων EEP. Στον ΠΙΝΑΚΑΣ XVIII, φαίνονται οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για να γίνουν οι στοχευμένες μεταλλάξεις χρησιμοποιώντας ως μήτρα το cDNA της AtHESP. Πιο συγκεκριμένα, μεταλλάχθηκε το γλουταμικό οξύ (Glu, E) που βρίσκεται στη θέση 143 της αλληλουχίας προς το αμινοξύ αλανίνη (Ala, A). Ομοίως και για τα κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος (Asp, D) που βρίσκονται στις θέσεις 308 και 366 αντίστοιχα και μεταλλάχθηκαν, επίσης στο αμινοξύ αλανίνη. Επιπρόσθετα, μεταλλάχθηκε και ένα κατάλοιπο ιστιδίνης (His, H) στη θέση 405 προς αλανίνη. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι ίδια με εκείνη της αντικατάστασης της αλληλουχίας αναγνώρισης της πρωτεάσης 3C στον φορέα pET-15b, με ορισμένες τροποποιήσεις στο θερμικό πρότυπο των αντιδράσεων, όπως φαίνεται στον ΠΙΝΑΚΑΣ XI και

ΠΙΝΑΚΑΣ XII.

ΠΙΝΑΚΑΣ X. ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΣΤΟΧΕΥΟΜΕΝΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗΣ ΣΤΗΝ AtHESP

2X ΚΑΡΑ HiFi HotStart Ready Mix	25 μL
Εκκινητής (10μM) ⁸	1,3 μL
Πλασμιδιακό DNA ⁹	1,5 μL
ddH ₂ O	22,2 μL
Υτελ	50 μL

ΠΙΝΑΚΑΣ XI. Το ΘΕΡΜΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ PCR.

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95	3 min	10 κύκλοι αντίδρασης
Αποδιάταξη	98	20 sec	
Υβριδοποίηση	65	90 sec	
Επέκταση	72	8 min	

⁸ Η αντίδραση για τον έμπροσθεν εκκινητή (FW) έγινε ξεχωριστά από την αντίδραση για τον όπισθεν εκκινητή (REV)

⁹ Τα συστατικά της αντίδρασης για την προσθήκη της θέσης αναγνώρισης της πρωτεάσης 3C είναι ίδια και για το φορέα pET-15b που φέρει το ένθεμα της AtHESP και για εκείνον που δε φέρει κάποιο ένθεμα.

ΠΙΝΑΚΑΣ XII. ΤΟ ΘΕΡΜΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ PCR.

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95	3 min	15 κύκλοι αντίδρασης
Αποδιάταξη	98	20 sec	
Υβριδοποίηση	60	1 min	
Επέκταση	72	8 min	
Τελική επέκταση	72	20 min	

Η διαδικασία πέραν αυτού του σημείου ακολούθησε ακριβώς όπως και παραπάνω.

3.2.6 Έλεγχος προτύπου έκφρασης της ανασυνδυασμένης HESP

3.2.6.1 Καλλιέργειες βακτηρίων

Αφού διαπιστώθηκε η ύπαρξη και η ορθότητα της κατασκευής pGEX-Hesp μετά την υποκλωνοποίηση με διπλή πέψη (βλ. 0) και αλληλούχηση, έγινε έλεγχος έκφρασης της πρωτεΐνης σε διάφορες συνθήκες. Εξετάστηκαν οι κυτταρικές σειρές *BL21- Gold (DE3)*, *Rosetta 2*, *B834 (DE3)*, η επαγωγή της υπερέκφρασης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις επαγωγέα (IPTG) και ταυτόχρονα η επαγωγή της υπερέκφρασης σε διάφορες θερμοκρασίες ώστε να γίνει έλεγχος εάν η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη εκφράζεται σε αδιάλυτη μορφή ως κυτταρικό έγκλειστο.

- Επαγωγή υπερέκφρασης στους 37°C: 30mL αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου LB Broth, στο οποίο έχει προστεθεί αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 50μg/mL, εμβολιάστηκαν με 1/100 από μία καλλιέργεια των 5mL που έχει αναπτυχθεί για 16h, και επωάζονται στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (210rpm) ώσπου η οπτική απορρόφηση της οπτικής πυκνότητας ήταν $OD_{600nm}=0.6-0.7$ όπου και θεωρείται ότι η καλλιέργεια βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Ακολούθησε επαγωγή της υπερέκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Η καλλιέργεια διαιρέθηκε σε 3 σωλήνες τύπου falcon χωρητικότητας 50mL (3x10mL καλλιέργειας) οι οποίοι ονομάστηκαν: “control”, “0.5” και “1”. Στο σωλήνα “control” δεν προστέθηκε επαγωγέας, στο σωλήνα “0.5” προστέθηκε επαγωγέας (IPTG) σε τελική συγκέντρωση 0.5mM και στο σωλήνα “1” προστέθηκε επαγωγέας (IPTG) σε τελική συγκέντρωση 1mM. Οι καλλιέργειες μετά την επαγωγή της υπερέκφρασης αφέθηκαν να αναπτυχθούν για ακόμη 4h στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (210rpm). Μετά το πέρας της επώασης, η καλλιέργεια τοποθετήθηκε στον πάγο και το σύνολο της καλλιέργειας (10mL) εναποτέθηκε σε σωλήνες τύπου erpendorf χωρητικότητας 1.5mL. Κάθε σωλήνας ονομάστηκε αντίστοιχα με την καλλιέργεια (“control”, “0.5” και “1”) και φυγοκεντρήθηκε στα 11000xg για 1min στους 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και τα κυτταρικά ιζήματα φυλάχθηκαν στους -80 °C. Ακολούθησε η ίδια διαδικασία και για τις

τρεις κυτταρικές σειρές. Να σημειωθεί πως όλοι οι χειρισμοί βακτηρίων και αποστειρωμένων θρεπτικών μέσων, γίνονται υπό στείρες συνθήκες μέχρι και το στάδιο της φυγοκέντρωσης.

- Επαγωγή υπερέκφρασης σε χαμηλή θερμοκρασία: 30mL αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου LB Broth, στο οποίο έχει προστεθεί αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 50μg/mL, εμβολιάστηκαν με 1/100 από μία καλλιέργεια των 5mL που έχει αναπτυχθεί για 16h, και επωάζονται στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (210rpm) ώσπου η οπτική απορρόφηση της οπτικής πυκνότητας ήταν $OD_{600nm}=0.6-0.7$ όπου και θεωρείται ότι η καλλιέργεια βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Ακολούθησε επαγωγή της υπερέκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Η καλλιέργεια διαιρέθηκε σε 3 σωλήνες τύπου falcon χωρητικότητας 50mL (3x10mL καλλιέργειας) οι οποίοι ονομάστηκαν: “control”, “0.1” και “0.5”. Στο σωλήνα “control” δεν προστέθηκε επαγωγέας, στο σωλήνα “0.1” προστέθηκε επαγωγέας (IPTG) σε τελική συγκέντρωση 0.1mM και στο σωλήνα “0.5” προστέθηκε επαγωγέας (IPTG) σε τελική συγκέντρωση 0.5mM. Οι καλλιέργειες μετά την επαγωγή της υπερέκφρασης αφέθηκαν να αναπτυχθούν για 12-16h σε χαμηλή θερμοκρασία (στους 25°C για τα *BL21- Gold (DE3)* και στους 18 °C για τα *B834 (DE3)*) υπό συνεχή ανάδευση (210rpm). Μετά το πέρας της επώασης, η καλλιέργεια τοποθετήθηκε στον πάγο και το σύνολο της καλλιέργειας (10mL) εναποτέθηκε σε σωλήνες τύπου er-pendorf χωρητικότητας 1.5mL. Κάθε σωλήνας ονομάστηκε αντίστοιχα με την καλλιέργεια (“control”, “0.1” και “0.5”) και φυγοκεντρήθηκε στα 11000xg για 1min στους 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και τα κυτταρικά ιζήματα φυλάχθηκαν στους -80 °C. Η κυτταρική σειρά *Rosetta 2* δεν εξετάστηκε σε χαμηλότερη θερμοκρασία των 37°C. Να σημειωθεί πως όλοι οι χειρισμοί βακτηρίων και αποστειρωμένων θρεπτικών μέσων, γίνονται υπό στείρες συνθήκες μέχρι και το στάδιο της φυγοκέντρωσης.

3.2.6.2 Λύση κυττάρων

Το κυτταρικό ίζημα που συλλέχθηκε μετά την υπερέκφραση, αποψύχθηκε ελαφρώς σε πάγο ώστε να είναι εύκολο στη μεταχείριση. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 2 και στη συνέχεια το διάλυμα υποβλήθηκε σε μηχανική λύση με υπερήχους. Η πλήρης λύση των κυττάρων έγινε σε 3 κύκλους των 60 sec, όπου η συσκευή υπερήχων επί 20 sec παράγει υπερήχους εύρους 20%, σε συνεχόμενους κύκλους, οι οποίοι διαπερνούν το κυτταρόλυμμα και για 40 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 με παύσεις και ενώ ο σωλήνας, στον οποίο εμπεριέχεται το διάλυμα προς λύση, βρίσκεται σε πάγο ώστε να αποφευχθεί η ανεπιθύμητη αυτή αύξηση της θερμοκρασίας. Στο στάδιο αυτό, φυλάχθηκε δείγμα (~50μL) του ολικού εκχυλίσματος, καθώς στο διάλυμα των λυμένων κυττάρων περιέχονται και διαλυτά και αδιάλυτα στοιχεία, το

οποίο θα ελεγχθεί με ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE). Στη συνέχεια, το υπόλοιπο διάλυμα των λυμμένων κυττάρων υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση στις 13000rpm/4°C για 30 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση, διαχωρίστηκε το υπερκείμενο από το ίζημα, καθώς αποτελείται από τα κυτταρικά υπολείμματα και το υπερκείμενο φυλάχθηκε στους -20 °C, έως ότου έγινε ανάλυση με SDS-PAGE. Το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος δειγμάτων για SDS-PAGE 4x και υποβλήθηκε εκ νέου σε λύση με υπερήχους ώστε στο ίζημα όπου υπάρχουν και τα κυτταρικά έγκλειστα, να σπάσουν και το εκχύλισμα να αναλυθεί σε SDS-PAGE. Η λύση έγινε σε 2 κύκλους των 14 sec, όπου η συσκευή υπερήχων επί 4 sec παράγει υπερήχους εύρους 20%, σε συνεχόμενους κύκλους, οι οποίοι διαπερνούν το κυτταρόλυμα και για 10 sec σταματάει την παραγωγή υπερήχων.

3.2.6.3 *Μεσαίας κλίμακας απομόνωση της ανασυνδυασμένης GST-Hesp με σφαιρίδια GST 4B*

Ο προσδέτης (γλουταθειόνη) είναι προσδεμένος σε δίκτυο αγαρόζης 4% (σεφαρόζη) με ένα συνδέτη 10 ανθράκων. Όσο αλλάζει η συγκέντρωση της αγαρόζης, μειώνεται το μέγεθος των πόρων. Αυτό το χαρακτηριστικό της αγαρόζης αυξάνει την ακαμψία των αλυσίδων της αγαρόζης και αλλάζει το εύρος της κλασμάτωσης. Η συνδεδεμένη (cross-linked) αγαρόζη είναι χημικά και φυσικά πιο ανθεκτική από την απλή αγαρόζη, επιπρόσθετα επιδεικνύει καλύτερα χαρακτηριστικά ροής και ανθεκτικότητας σε οργανικούς διαλύτες.

Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν διαθέσιμο από τη *GE Healthcare* και η μεσαίας κλίμακας απομόνωση της GST-HESP έγινε ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή με τροποποιήσεις. Πιο συγκεκριμένα, αφού το υλικό (που περιέχει τα σφαιρίδια) εξισορροπήθηκε με το ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης 2, προστέθηκε το κυτταρόλυμα και επώαστηκαν για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό διαρκή περιστροφή. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε καθίζηση των σφαιριδίων με φυγοκέντρηση στα 400xg για 5 min, το υπερκείμενο της οποίας φυλάχθηκε ως το υπερδιήθημα. Κατόπιν, προστέθηκαν 5cn ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης, και αφού η ιλύς αναδεύτηκε, υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση στα 400xg για 5 min. Το υπερκείμενο της οποίας φυλάχθηκε ως το κλάσμα έκπλυσης. Το βήμα έκπλυσης των πρωτεϊνών από τα σφαιρίδια επαναλήφθηκε δυο επιπλέον φορές. Τέλος, η έκλυση της πρωτεΐνης από τα σφαιρίδια έγινε με προσθήκη 0,5cn ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2-5 λεπτά υπό διαρκή περιστροφή και φυγοκέντρηση στις 400xg για 5 min. Το βήμα έκλυσης των πρωτεϊνών από τα σφαιρίδια επαναλήφθηκε δυο επιπλέον φορές.

Εναλλακτικά, το κυτταρόλυμα επώαστηκε για 2h στους 4°C υπό συνεχή περιστροφή. Κατόπιν, η ιλύς υπέστη φυγοκέντρηση στις 400xg για 5 min και το ίζημα, αποτελούμενο από τα σφαιρίδια και

την ακινητοποιημένη πρωτεΐνη (*GST-AtHESP*), αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE).

3.2.7 Ηλεκτροφόρηση

3.2.7.1 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων

3.2.7.1.1 Ηλεκτροφόρηση DNA

Η ηλεκτροφόρηση συγκεκριμένων τμημάτων DNA σε πηκτές αγαρόζης και η απομόνωση τους από αυτές αποτελεί έναν απλό και αποδοτικό τρόπο διαχωρισμού και καθαρισμού τους. Η μέθοδος βασίζεται στην παρασκευή πηκτών με προσθήκη αγαρόζης σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και θέρμανση έως ότου σχηματιστεί ένα διαυγές διάλυμα. Με την ψύξη του διαλύματος σχηματίζεται ένα πλέγμα του οποίου η πυκνότητα εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου τα τμήματα του DNA, που είναι αρνητικά φορτισμένα σε ουδέτερο pH, μετακινούνται προς την άνοδο. Η ταχύτητα μετακίνησης των τμημάτων DNA εξαρτάται από το μέγεθος των τμημάτων του DNA, τη συγκέντρωση της αγαρόζης, τη διαμόρφωση των τμημάτων DNA, το δυναμικό που εφαρμόζεται στα άκρα της πηκτής και τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε πηκτή με συγκέντρωση αγαρόζης 1% ή 1,5%, σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE, παρουσία Midori Green. Το Midori Green παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και αποτελεί μια μη καρκινογόνο εναλλακτική του βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) για την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτές αγαρόζης. Εκπέμπει πράσινο φθορισμό όταν είναι προσδεδεμένο σε DNA ή RNA (~530nm) όταν διεγερθεί από υπεριώδη ακτινοβολία χαμηλού μήκους κύματος (~270nm) [64]. Το ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση των νουκλεϊκών οξέων που χρησιμοποιήθηκε είναι το TAE 1x, ενώ έγινε εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου τάσης 90V και παρακολούθηση του μετώπου των χρωστικών που ενυπάρχουν στο ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης (6x loading buffer). Η απομόνωση και ο καθαρισμός του προϊόντος της PCR και του προϊόντος της πέψης (βλ. 3.2.1.1) από την πηκτή αγαρόζης πραγματοποιήθηκε με το kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

3.2.7.1.2 Ηλεκτροφόρηση RNA

Η ηλεκτροφόρηση RNA σε πηκτή ακρυλαμιδίου είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση, ποσοτικοποίηση, το διαχωρισμό βάσει μεγέθους και την εκτίμηση της ποιότητας του RNA. Το RNA φέρει αρνητικό φορτίο, συνεπώς μεταναστεύει προς την άνοδο παρουσία ηλεκτρικού ρεύματος. Η πηκτή δρα ως ηθμός ώστε να παρακωλύσει η μετανάστευση του RNA αναλογικά με τη μάζα

του, δεδομένου ότι η μάζα του είναι γενικά αναλογική με το φορτίο του. Η μάζα σχετίζεται κατά προσέγγιση με το μήκος της αλυσίδας RNA, το μήκος ενός RNA καθορίζεται από την απόσταση που θα διανύσει στην πηκτή. Η ηλεκτροφόρηση RNA γίνεται είτε σε πηκτές ακρυλαμιδίου είτε σε πηκτές αγαρόζης. Η ηλεκτροφόρηση RNA είναι πιο κατάλληλη για διαχωρισμό μικρών τμημάτων RNA έως 600 νουκλεοτίδια, ενώ η ηλεκτροφόρηση αγαρόζης βρίσκει εφαρμογή στο διαχωρισμό μεγαλύτερων τμημάτων RNA [65].

Η ηλεκτροφόρηση RNA σε πηκτή ακρυλαμιδίου μπορεί να γίνει υπό αποδιατακτικές συνθήκες είτε υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες. Η ηλεκτροφόρηση RNA σε ακρυλαμίδιο υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες επιτρέπει το διαχωρισμό διαμορφώσεων και εναλλακτικά αναδιπλωμένων ειδών RNA. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να διαχωρίσει σύμπλοκα RNA-πρωτεϊνών και να εντοπιστεί ο σχηματισμός συμπλόκων RNA μέσω της διαφορετικής ηλεκτροφορητικής κινητικότητάς του [66]. Κατά την ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες το διάλυμα ακρυλαμιδίου αναμιγνύεται με ουρία, η οποία δρα ως αποδιατακτικός παράγοντας καταργώντας ηλεκτροστατικές και άλλες ασθενείς αλληλεπιδράσεις όπως οι δεσμοί υδρογόνου, αποδιατάσσοντας με αυτό τον τρόπο τυχόν δευτεροταγείς διαμορφώσεις εντός της αλυσίδας του RNA [66]. Η διαδικασία της παρασκευής της πηκτής καθώς και της ηλεκτροφόρησης έχει μεγάλες ομοιότητες με την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών με κύριες διαφορές το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης, τη σύσταση της πηκτής και το ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων. Σημειώνεται, επίσης, πως στην ηλεκτροφόρηση RNA σε πηκτή ακρυλαμιδίου, αντίθετα με την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες, το σύστημα δεν είναι ασυνεχές, δεν απαρτίζεται δηλαδή από μια πηκτή διαχωρισμού και μια πηκτή επιστίβαξης, αλλά αντίθετα από μια πηκτή διαχωρισμού.

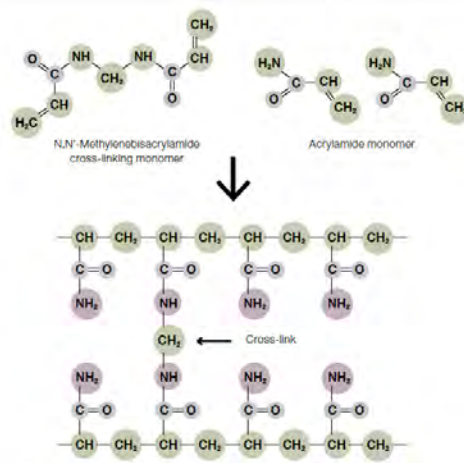
Σύσταση πηκτής	
	20%
20% Μίγμα ακρυλαμιδίου-Ουρίας 8M	10 mL
APS 10%	100 µL
TEMED	10 µL

3.2.7.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

3.2.7.2.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών 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 επιστί-

βαξης 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 (βλ. ΠΙΝΑΚΑΣ XIII). Ο ρόλος της πηκτής επιστίβαξης 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. Καθώς σε ένα μίγμα πρωτεϊνών εμπεριέχονται πρωτεΐνες διαφόρων μοριακών βαρών, η κίνηση αυτών περιορίζεται από την πηκτή, που δρα ως ηθμός, καθώς το μέγεθος των πόρων του πλέγματος που δημιουργούνται αυξάνει τις διαφορές στην κινητικότητα μεταξύ πρωτεϊνών που διαφέρουν σε μέγεθος. Ο σχηματισμός της πηκτής γίνεται με την αντίδραση πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου και δις-ακρυλαμιδίου, 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 (βλ. Σχήμα 7). 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 επιστίβαξης. 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.3.1.7) το οποίο πρέπει να είναι σε επαφή με την πηκτή σε όλο της το μήκος και πλάτος. Τα δείγματα προετοιμάζονται με ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων 4× έτσι ώστε σε όλα να περιέχεται ίση συγκέντρωση πρωτεΐνης και η τελική αραιώση των δειγμάτων να είναι 1×. Στη συνέχεια, τοποθετούνται για 5min στους 95-98°C ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη 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 [67].



Σχήμα 7. Πολυμερισμός μονομερών ακρυλαμιδίου και δισακρυλαμιδίου

Η ηλεκτροφόρηση πηκτών ακρυλαμιδίου, γενικά, είναι μια αναλυτική μέθοδος διαχωρισμού των συστατικών ενός μίγματος πρωτεϊνών βάσει του μεγέθους τους. Η τεχνική αυτή βασίζεται 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 αλληλεπιδράσεις 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.

Η γλυκίνη είναι ασθενές οξύ και μπορεί να απαντηθεί σε δυο καταστάσεις, ένα αφόρτιστο αμφιριόν ή ένα φορτισμένο γλυκινικό ανιόν. Σε χαμηλή τιμή pH, πρωτονιώνεται και άρα είναι αφόρτιστη. Σε υψηλότερες τιμές pH φορτίζεται αρνητικά. Κατά τη διαβίβαση ηλεκτρικού ρεύματος, τα ιόντα της γλυκίνης απομακρύνονται από την κάθοδο και μεταναστεύουν προς την άνοδο. Στην άνοδο βρίσκεται η πηκτή επιστίβαξης και τα δείγματα που έχουν χαμηλή τιμή pH (pH 6.8) οπότε η γλυκίνη χάνει το φορτίο της και δεν μεταναστεύει με μεγάλη ταχύτητα. Παράλληλα, στην πηκτή και στο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης περιέχονται ιόντα χλωρίου τα οποία απομακρύνονται, επίσης, από την κάθοδο με υψηλή κινητικότητα. Αυτό το γεγονός δημιουργεί μια στενή ζώνη χαμηλής αγωγιμότητας στην κορυφή της πηκτής επιστίβαξης όπου συγκεντρώνεται όλη η τάση του ρεύματος. Η πολύ υψηλή τάση του πεδίου οδηγεί τις αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες (από το SDS) να μεταναστεύσουν προς την κάθοδο. Οι πρωτεΐνες λόγω του υψηλού λόγου φορτίο/μάζα που διαθέτουν σε σχέση με τη γλυκίνη κινούνται ταχύτερα από τη γλυκίνη, αλλά βραδύτερα από τα ιόντα χλωρίου. Αυτό το φαινόμενο παρατηρείται μακροσκοπικά με τη συμπύκνωση του μετώπου ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων σε μια πολύ στενή ζώνη που μεταναστεύει προς την πηκτή διαχωρισμού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα όλες οι πρωτεΐνες που εμπεριέχονται στην πηκτή να εισέλθουν ταυτόχρονα στην πηκτή διαχωρισμού όπου η

μετανάστευση είναι συνάρτηση του μοριακού μεγέθους καθώς αυξάνεται και η τριβή μεταξύ πρωτεϊνών και των πόρων του πλέγματος της πηκτής διαχωρισμού. Μόλις οι πρωτεΐνες εισέλθουν στην πηκτική διαχωρισμού η τιμή του pH είναι αρκετά υψηλότερη όπου η γλυκίνη φορτίζεται αρνητικά και ως εκ τούτου έχει μεγαλύτερη κινητικότητα προς την άνοδο, ενώ οι πρωτεΐνες επιβραδύνονται διότι η πηκτική δρα ως ηθμός. Το αποτέλεσμα είναι πως οι πρωτεΐνες δε βρίσκονται πλέον σε μια στενή ζώνη υψηλής αντίστασης και υψηλού ηλεκτρικού πεδίου και έτσι αφήνονται να διαχωριστούν στο ενιαίο ηλεκτρικό πεδίο όπου μεταναστεύουν μέχρι να μην επιτρέπει το μέγεθός τους να διαπεράσουν τους πόρους του πλέγματος της πηκτής [68]. 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 πηκτική.

ΠΙΝΑΚΑΣ XIII. ΣΥΣΤΑΣΗ ΠΗΚΤΩΝ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ & ΕΠΙΣΤΙΒΑΞΗΣ

Πηκτική διαχωρισμού		Πηκτική επιστίβαξης	
	10%		5%
dH₂O	1.9 mL	dH₂O	2.1 mL
Tris-HCl 1.5M pH8.8	1.3 mL	Tris-HCl 1M pH6.8	380 µL
SDS 10%	50 µL	SDS 10%	30 µL
Μίγμα ακρυλαμιδίου 30%	1.7 mL	Μίγμα ακρυλαμιδίου 30%	500 µL
APS 10%	50 µL	APS 10%	30 µL
TEMED	2 µL	TEMED	3 µL

3.2.7.2.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (Native-PAGE)

Η μέθοδος ηλεκτροφόρησης σε πηκτική 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 απaráμιλλης 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 πηκτική 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 πηκτική. 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 επιστίβαξης. Μόλις οι πρωτεΐνες φτάσουν στο σημείο διαχωρισμού της πηκτής επιστίβαξης 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. ΠΙΝΑΚΑΣ XIV). 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 ηλεκτροφόρησης 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 XIV. ΣΥΣΤΑΣΗ ΠΗΚΤΩΝ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ & ΕΠΙΣΤΙΒΑΞΗΣ NATIVE- PAGE

Πηκτή διαχωρισμού	10%		7%		Πηκτή επιστίβαξης	4%	
	dH ₂ O	2.569 mL	3,112 mL	dH ₂ O		3.2 mL	
Tris-HCl 1.5M pH8.8	1.462 mL	1,462 mL	Tris-HCl 1M pH6.8	1.25 μL			
Μίγμα ακρυλαμιδίου 30%	1.943 mL	1,4 mL	Μίγμα ακρυλαμιδίου 30%	500 μL			
APS 10%	20.89 μL	20,89 μL	APS 10%	50 μL			
TEMED	4.8 μL	4,8 μL	TEMED	5 μL			

3.2.7.2.2.1 Ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες παρουσία ουρίας σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις

Η προετοιμασία της πηκτής για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε μη αποδιατακτικές (native) συνθήκες έγινε ακριβώς όπως περιγράφηκε παραπάνω. Η διαφορά έγκειται στην προετοιμασία των δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση, στα οποία η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι σταθερή και προστίθενται στα δείγματα αυξανόμενες συγκεντρώσεις ουρίας [69].

3.2.8 Υπερέκφραση της AtHESP από τα κύτταρα BL21-Gold (DE3)

Σε τέσσερις φλάσκες, χωρητικότητας 2L, η κάθε μία, τοποθετήθηκε υγρό θρεπτικό μέσο LB Broth, όγκου $\leq 1/3$ της χωρητικότητας της φλάσκας. Οι αποστειρωμένες φλάσκες διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τη χρήση τους. Υπό στείρες συνθήκες, προστέθηκε στις φλάσκες από 50μg/mL του αντιβιοτικού αμπικιλίνη. Έγινε λήψη 1mL του θρεπτικού μέσου μετά την προσθήκη του

αντιβιοτικού, το οποίο αποτέλεσε το μάρτυρα κατά τη φασματοφωτομετρική παρακολούθηση της πορείας της καλλιέργειας. Στη συνέχεια, οι φλάσκες εμβολιάστηκαν με όγκο 1/100 από μια υγρή καλλιέργεια των *BL21-Gold* και επωάστηκαν στους 37°C υπό ανάδευση (180-210rpm) ώσπου η οπτική απορρόφηση της οπτικής πυκνότητας ήταν $OD_{600nm}=0.7$ όπου και θεωρείται ότι η καλλιέργεια βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Ακολούθησε επαγωγή της υπερέκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με την προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM. Η επαγωγή της υπερέκφρασης διήρκησε 4h στους 37 °C υπό ανάδευση (180-210 rpm). Όσο είναι παρόν το IPTG στη βακτηριακή καλλιέργεια, θα παράγεται το RNA της προς μελέτη πρωτεΐνης. Μετά το πέρας της επαγωγής, οι φλάσκες τοποθετήθηκαν στους 4 °C ώστε να βραχυυνθεί η βακτηριακή ανάπτυξη. Η καλλιέργεια των βακτηρίων φυγοκεντρήθηκε σε δοχεία συλλογής στις 4000rpm/4°C για 30min. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε καθώς αποτελεί το θρεπτικό μέσο και το κυτταρικό ίζημα φυλάχθηκε στους -80°C.

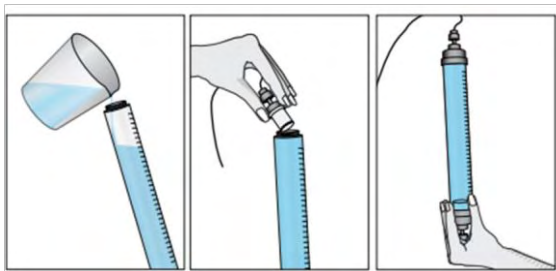
3.2.9 Λύση βακτηριακών κυττάρων

Το κυτταρικό ίζημα που συλλέχθηκε μετά την υπερέκφραση, αποψύχθηκε ελαφρώς σε πάγο ώστε να είναι εύκολο στη μεταχείριση. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 3 και στη συνέχεια το διάλυμα υποβλήθηκε σε μηχανική λύση με υπερήχους. Η πλήρης λύση των κυττάρων έγινε σε 6 κύκλους των 60 sec, όπου η συσκευή υπερήχων επί 30 sec παράγει υπερήχους εύρους 70%, σε συνεχόμενους κύκλους, οι οποίοι διαπερνούν το κυτταρόλυμμα και 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 με παύσεις και ενώ ο σωλήνας, στον οποίο εμπεριέχεται το διάλυμα προς λύση, βρίσκεται σε πάγο ώστε να αποφευχθεί η ανεπιθύμητη αυτή αύξηση της θερμοκρασίας. Στη συνέχεια, το διάλυμα των λυμένων κυττάρων υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση στις 15000rpm/4°C για 60 λεπτά.

3.2.9.1 Υγρή χρωματογραφία αχιστείας (σύστημα FPLC)

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 φυγοκέντρηση των βακτηριακών κυττάρων, το υπερκείμενο πέρασε από φίλτρο διαμέτρου πόρων 0.45μm και στη συνέχεια το διάλυμα των πρωτεϊνών εναποτέθηκε στο σωλήνα superloop (βλ. Σχήμα 8). Για την απομόνωση τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται είναι τα διαλύματα εξισορρόπησης-έκπλυσης και έκλουσης, τα οποία πριν χρησιμοποιηθούν φιλτραρίστηκαν υπό κενό με φίλτρο 0.45μm και απαερώθηκαν με χρήση υπερή-

χων. Τα διαλύματα εξισορρόπησης-έκπλυσης και έκλουσης τοποθετούνται στις αντίστοιχες αντλίες του μηχανήματος *ÄKTApurifier* (GE Healthcare). Η πορεία της χρωματογραφίας ελέγχεται από το υπολογιστικό πρόγραμμα Unicorn™.



Σχήμα 8. Εισαγωγή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος στον κύλινδρο superloop [70].

3.2.9.2 Απομόνωση της *GST-Hesr* με στήλη αγκιστείας *GSH* αγαρόζης

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι η Protino® GST-4B (Macherey-Nagel) η οποία είναι μια στήλη όγκου 1mL σφαιριδίων αγαρόζης, η οποία εξισορροπήθηκε με 15-20 όγκους στήλης από το αντίστοιχο διάλυμα. Στη συνέχεια, ρυθμίζοντας την πίεση και το ρυθμό ροής, το διάλυμα των πρωτεϊνών πέρασε μέσα από τη στήλη και ό,τι είναι ειδικό προς αυτή να προσδένεται στα σφαιρίδια αγαρόζης που φέρουν γλουταθειόνη και ό,τι δεν είναι ειδικό εκπλύθηκε στα κλάσματα υπερδιηθήματος (flow-through). Η απομόνωση ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης με GST, βασίζεται στην αρχή πως η ανασυνδυσμένη πρωτεΐνη θα αλληλεπιδράσει με τον προσδέτη (τη γλουταθειόνη) που βρίσκεται πάνω στα σφαιρίδια του μέσου και οι προσμίξεις απομακρύνονται από τη στήλη με τη ροή του ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης-έκπλυσης. Η ανασυνδυσμένη πρωτεΐνη προσδένεται στη γλουταθειόνη που είναι ακινητοποιημένη στο υλικό της στήλης καθώς έχει μεγάλη αγκιστεία για το κέντρο πρόσδεσης της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) [58]. Τέλος, η έκλουση των πρωτεϊνών από τη στήλη γίνεται με συγκέντρωση 100% του ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης, το οποίο περιέχει περίσσεια ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) (βλ Σχήμα 9, A).

Η στήλη εκπλύθηκε με 10cv διαλύματος εξισορρόπησης και κατόπιν με 10cv διαλύματος έκλουσης. Για να αποθηκευτεί, ακολουθούν κάποια βήματα σύντομης έκπλυσης με 10cv διαλύματος pH 8.5 (0.1M Tris, 0.5M NaCl: αντλία A) και κατόπιν με 10cv διαλύματος pH 4.5 (0.1M Sodium acetate, 0.5M NaCl: αντλία B). Το τελευταίο βήμα επαναλαμβάνεται εις διπλούν. Τέλος, εξισορροπείται εκ νέου η στήλη με 5cv 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 ($\lambda=280\text{nm}$) των κλασμάτων καθ' όλη τη διάρκεια του καθαρισμού.

3.2.9.3 Αφαίρεση σηματοδοτικής ετικέτας από την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη GST-HESP

Οι ετικέτες αγχιστείας (affinity tags) είναι απαραίτητα εργαλεία για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών καθώς όχι μόνο διευκολύνουν την ταυτοποίηση και την απομόνωση των πρωτεϊνών με τις οποίες είναι συντηγμένες, όπως προβλεπόταν από την αρχή, αλλά επίσης μπορεί να έχουν ωφέλιμη επίδραση στις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες και να οδηγήσουν στην αύξηση της διαλυτότητας και να προωθήσουν τη σωστή τους αναδίπλωση [48].

Όλες οι ετικέτες αγχιστείας, είτε μεγάλες είτε μικρές, είναι πιθανό να επέμβουν στη βιολογική δράση της πρωτεΐνης, να παρεμποδίσουν την κρυστάλλωσή της ή να επηρεάσουν τη συμπεριφορά της με άλλο τρόπο [47]. Συνεπώς, είναι συνήθως επιθυμητό, και συνετό, να αφαιρεθεί η ετικέτα αγχιστείας [47, 48]. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιούνται ένζυμα, είτε ενδοπρωτεάσες είτε εξωπρωτεάσες [48]. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η ενδοπρωτεάση 3C.

Παρότι υπάρχουν ενδοπρωτεάσες με υψηλή εξειδίκευση, που έχουν εξομαλύνει το πρόβλημα της μη ειδικής πέψης, η αποτελεσματικότητα της πέψης ποικίλει απρόβλεπτα με κάθε ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη και θα πρέπει κανείς να είναι προετοιμασμένος πως κάποιο τμήμα της πρωτεΐνης δε θα υποστεί πέψη. Η πρωτεάση 3C έχει απομονωθεί από τον ρινοϊό 14 που προσβάλλει τον άνθρωπο οδηγώντας σε λοιμώξεις της αναπνευστικής οδού [48]. Η πρωτεάση 3C έχει αυστηρή εξειδίκευση ως προς την αλληλουχία που αναγνωρίζει. Η αλληλουχία που αναγνωρίζει είναι η LEVLFQ/GP, και ο παράγοντας που καθορίζει την εξειδίκευσή της βρίσκεται την καρβοξυ- πλευρά του τμήσιμου δεσμού (/) και ο οποίος θα παραμείνει στην πρωτεΐνη στόχο μετά την απομάκρυνση της ετικέτας αγχιστείας [47].

Η πρωτεάση 3C, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, είναι συντηγμένη με την πρωτεΐνη GST, ώστε να μπορεί να απομακρύνεται από το διάλυμα πρωτεΐνης μετά την πέψη με ένα επιπλέον βήμα καθαρισμού. Η θέση αναγνώρισης της πρωτεάσης ενυπάρχει στην αλληλουχία του φορέα pGEX-6p-1 και προτού χρησιμοποιηθεί για την πέψη της πρωτεΐνης έγινε έλεγχος εάν η αλληλουχία αναγνώρισης της πρωτεάσης υπάρχει στην αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης προς μελέτη. Μετά τον καθαρισμό της πρωτεΐνης από τη στήλη αγχιστείας, η πρωτεΐνη αναμιγνύεται με την πρωτεάση 3C. Η αναλογία που χρησιμοποιείται είναι 1mg πρωτεάσης 3C ανά 20mg πρωτεΐνης που πρόκειται να υποστεί πέψη. Μόλις αναμιχθούν τα διαλύματα των πρωτεϊνών, αναδεύονται πολύ ήπια σε κυκλική κίνηση και επωάζονται για 16h στους 4°C ώστε να ολοκληρωθεί η αντίδραση πέψης.

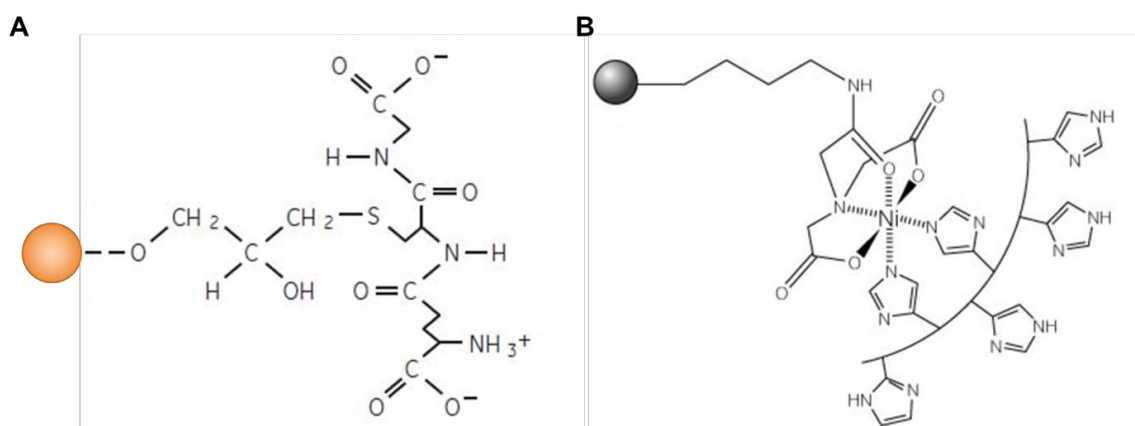
Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το δείγμα φορτώνεται στη στήλη αγχιστείας GST (όπως 3.2.9.2) και απομονώνονται τα κλάσματα υπερδιηθήματος (flow-through), όπου αναμένεται να εμπεριέχεται η πρωτεΐνη προς μελέτη, καθώς η ετικέτα αγχιστείας (GST) έχει αποκοπεί με την αντίδραση πέψης και εφόσον η πρωτεΐνη προς μελέτη δεν έχει κάποια αγχιστεία προς της στήλη πλέον, θα εκπλυθεί από αυτή χωρίς να προσδεθεί. Στη συνέχεια, στο βήμα έκλουσης η πρωτεάση 3C που

φέρει ετικέτα αγκιστείας GST, θα εκλουστεί από τη στήλη σε διακριτά βήματα, καθιστώντας δυνατή την απομόνωση της πρωτεΐνης χωρίς την παρουσία της ετικέτας αγκιστείας ή της πρωτεάσης.

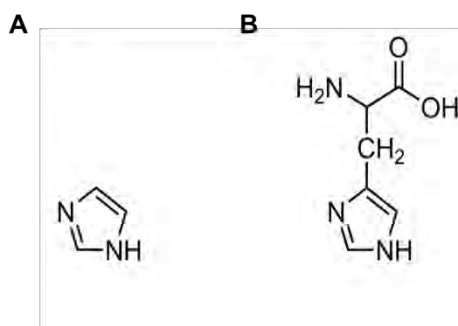
3.2.9.4 Απομόνωση της AtHESP με στήλη αγκιστείας Ni²⁺ σεφαρόζης

Η μέθοδος που βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ιόντων στοιχείων μετάπτωσης (Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺) τα οποία είναι ακινητοποιημένα πάνω σε ρητίνη και συγκεκριμένων πλευρικών αλυσίδων αμινοξέων, ονομάζεται χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC) [71]. Η ιστοδίνη είναι το αμινοξύ που επιδεικνύει την ισχυρότερη αλληλεπίδραση με τις ρητίνες που φέρουν ακινητοποιημένα ιόντα [71, 72], με τις ομάδες δοτών ηλεκτρονίων στον ιμιδαζολικό δακτύλιο της ιστοδίνης να σχηματίζει ημιπολικούς δεσμούς με το ακινητοποιημένο ιόν μετάλλου μετάπτωσης [71] (βλ. Σχήμα 9, Β).

Η στήλη που χρησιμοποιείται είναι η HisTrapHP, η οποία είναι μια στήλη όγκου 1mL Ni²⁺ σεφαρόζης, η οποία εξισορροπείται με 15-20 όγκους στήλης (cv) από το αντίστοιχο διάλυμα. Στη συνέχεια, ρυθμίζοντας την πίεση και το ρυθμό ροής, η πρωτεΐνη πέρασε μέσα από τη στήλη, ώστε ό,τι είναι ειδικό προς αυτή να προσδεθεί στα σφαιρίδια αγαρόζης, που φέρουν ακινητοποιημένο Ni²⁺, και ό,τι δεν είναι ειδικό να εκπλυθεί στα κλάσματα υπερδιηθήματος (flow-through). Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή πως τα ιόντα Ni²⁺ έχουν συγγένεια με την σηματοδοτική ετικέτα ιστοδινών που φέρει η πρωτεΐνη που έχει υπερεκφραστεί (βλ. Σχήμα 10). Κατά την έκλυση της στήλης, ό,τι δεν έχει αγκιστεία για τα σφαιρίδια αγαρόζης, που φέρουν το νικέλιο, θα εκπλυθεί και θα συλλεχθεί σε κλάσματα. Ακολούθως, συνεχίζει η έκλυση της πρωτεΐνης, η οποία γίνεται με βαθμίδωση συγκέντρωσης (0-100%) του διαλύματος έκλυσης. Μόλις το διάλυμα έκλυσης έχει φτάσει στο 100% της συγκέντρωσής του, η στήλη εξισορροπείται εκ νέου με διάλυμα εξισορρόπησης-έκπλυσης και στη συνέχεια αποθηκεύεται σε 20% αιθανόλη.



Σχήμα 9. Α. Σφαιρίδιο σεφαρόζης συνδεδεμένο με γλουταθειόνη Β. Σφαιρίδιο σεφαρόζης με ακινητοποιημένο Ni²⁺, στο σχήμα φαίνεται η αλληλεπίδραση με δυο ιστοδίνες.



Σχήμα 10. Α. ιμιδαζόλιο, Β. ιστιδίνη

3.2.9.5 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 [73]. Τα διάφορα υλικά που χρησιμοποιούνται για τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης είναι σφαιρικά σωματίδια, τα οποία διαθέτουν πόρους διαφόρων μεγεθών (βλ. Εικόνα 11. Α), έτσι ώστε τα μόρια που 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 11.Β, Γ) . Τα δείγματα εκλούνται ισοκρατικά (με τη χρήση ενός ρυθμιστικού διαλύματος και χωρίς την εφαρμογή βαθμίδωσης συγκέντρωσης που επιτυγχάνεται με δυο ρυθμιστικά διαλύματα) [74].

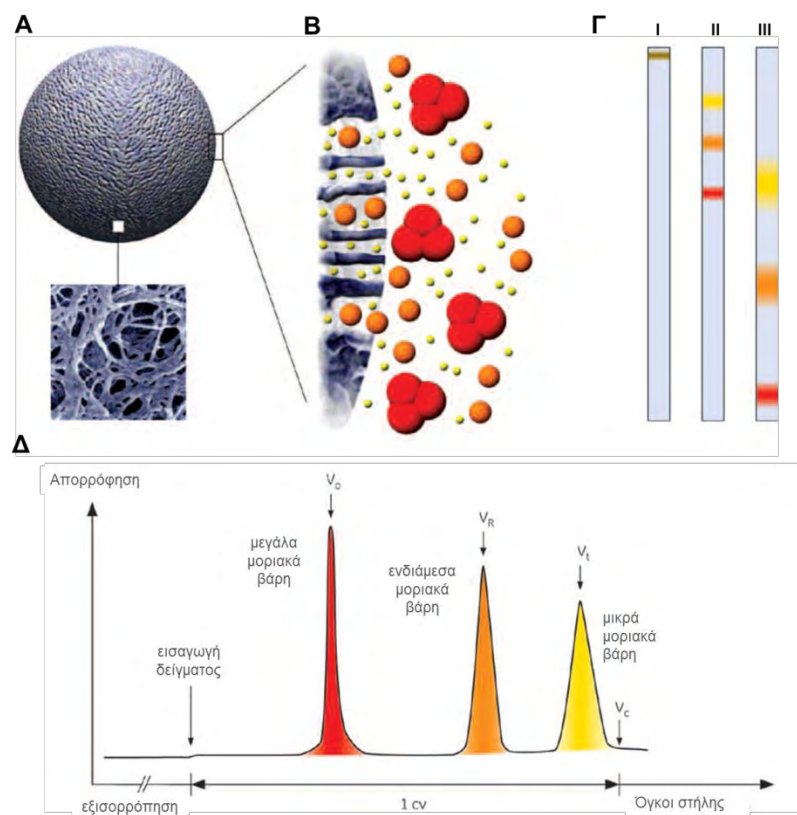
Σε αντίθεση με την χρωματογραφία συγγένειας ή ιοντοανταλλαγής, τα μόρια δεν προσδένονται πάνω στο υλικό της χρωματογραφίας, και αυτό έχει ως αποτέλεσμα το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται να μην επηρεάζει ιδιαίτερα το βαθμό διαχωρισμού μεταξύ των κορυφών. Αυτό το χαρακτηριστικό, χαρίζει το πλεονέκτημα στο χειριστή να μεταβάλλει 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 [73].

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 αφαιρωθεί 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 11. Γ,Δ). Αυτό το είδος διαχωρισμού χρησιμοποιείται ώστε να απομονωθεί ένα ή περισσότερα συστατικά, ώστε να δια-

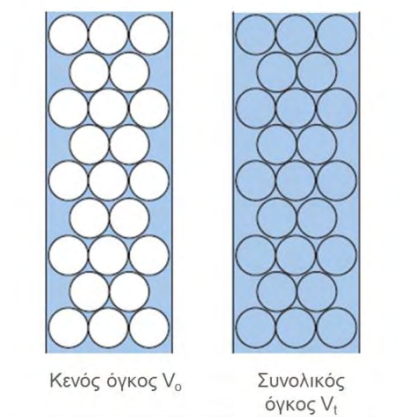
χωριστούν μονομερή από συσσωματώματα, ή ώστε να πραγματοποιηθεί ανάλυση κατανομής βάσει του μοριακού βάρους. Αυτό το είδος διαχωρισμού εφαρμόζεται σε δείγματα που εξ αρχής διαθέτουν λίγα συστατικά ή σε δείγματα που έχουν καθαριστεί μερικών από άλλες χρωματογραφικές τεχνικές έτσι ώστε οι ανεπιθύμητες πρωτεΐνες παρόμοιων μοριακών μεγεθών να έχουν εξαλειφθεί [74].

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 ddH₂O 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 ddH₂O, 20%EtOH, ddH₂O, 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, ακολουθεί η διαδικασία ξεπλύματος της στήλης, ξεπλένεται με έναν όγκο στήλης 0,5M NaOH σε χαμηλή ροή, στη συνέχεια, ξεπλένεται με τουλάχιστον έναν όγκο στήλης ddH₂O και αποθηκεύεται σε 20% EtOH.



Εικόνα 11. 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 αραιώση στις πρωτεΐνες κατά τη χρωματογραφία **Δ. Χρωματογράφημα.** C_v : όγκος στήλης, V_o : κενός όγκος στήλης (void volume) V_t : συνολικός όγκος στήλης (total volume) (GE Healthcare, *Gel Filtration, Methods & Principles, 2010*)



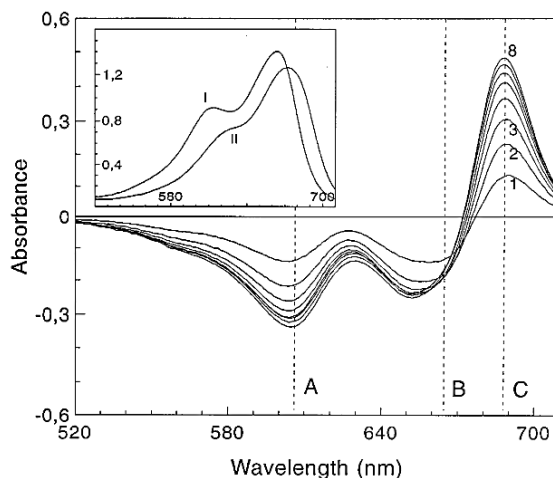
Εικόνα 12. Διαγραμματική αναπαράσταση του κενού όγκου και του συνολικού όγκου στήλης. Να σημειωθεί ότι $V_t - V_o$ ισούται με τον όγκο που καταλαμβάνει το στερεό υλικό που απαρτίζει το υλικό της στήλης (GE Healthcare, *Gel Filtration, Methods & Principles, 2010*)

3.2.10 Κινητικές μελέτες

3.2.10.1 Κινητικές μελέτες φασματοφωτομετρίας

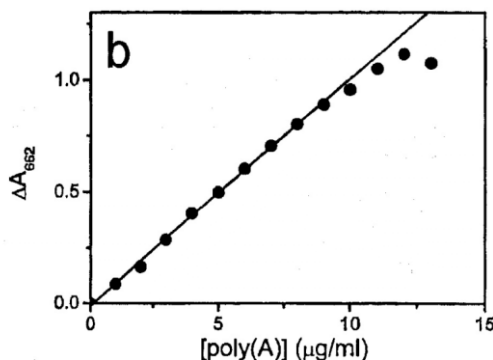
Η μέθοδος μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητας της AtHesp έγινε σύμφωνα με τους Greiner-Stoeffele, T., et al. (1996) [75] και Cheng, Y., et al (2006) [76] με τροποποιήσεις. Το κυανό του μεθυλενίου (3,7- δις(Διμεθυλάμινο)-φαινοθειαζίν-5- χλωρίδιο, κατά IUPAC) είναι μια ετεροκυκλική ένωση τριών δακτυλίων και ανήκει στην ομάδα των φαινοθειαζινών.

Η ανάμιξη του κυανού του μεθυλενίου με RNA προκαλεί αύξηση του μεγίστου της απορρόφησης του από τα 653nm στα 688nm (βλ. Σχήμα 11). Η αλλαγή αυτή στο φάσμα απορρόφησης 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 [75].



Σχήμα 11. 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. **A. φάσμα απορρόφησης διμερισμένου κυανού του μεθυλενίου, B. 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 [75].

Η AtHesp αποτελεί μια υδρολάση, δηλαδή, διασπά δεσμούς με την παρεμβολή νερού. Πιο συγκεκριμένα είναι μια πολύ(A) εξειδικευμένη ριβονουκλεάση με δράση εξωριβονουκλεάσης που πιθανόν απελευθερώνει 5' μονοφωσφοεστέρες [40]. Στην αντίδραση της απαδενυλίωσης το υπόστρωμα στο οποίο θα προσδεθεί το κυανό του μεθυλενίου είναι ένα πολυμερές πολυ(A). Η ανάμιξη του κυανού του μεθυλενίου με πολυ(A) προκαλεί μετατόπιση του μεγίστου του φάσματος απορρόφησης από τα 653nm στα 662nm αντί για τα 688nm [76] (βλ. Σχήμα 12). Η ενζυμική υδρόλυση που λαμβάνει χώρα μεταξύ του συμπλόκου πολυ(A)-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, πολυ(A)) [75].



Σχήμα 12. Διαφορά στο φάσμα απορρόφησης του κυανού του μεθυλενίου (1,2% w/v) σε διάφορες ποσότητες πολυ(A). Η συμπαγής ευθεία αντιπροσωπεύει τη γραμμή τάσης. Το φωτόμετρο βαθμονομήθηκε με διάλυμα κυανού του μεθυλενίου χωρίς πολυ(A) [76].

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 τόσο σωλήνες τύπου erpendorf στους οποίους θα ετοιμαστούν αντιδράσεις 100 μL (βλ. Πίνακας XV). Στη συνέχεια, προστίθενται 900 μL 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 φασματοφωτομόμετρο ορατού φωτός στα 662nm. Ακολουθεί η φωτομέτρηση του τυφλού (αντίδραση που δεν περιέχει ένζυμο) 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 δραστηριότητας της AtHesp είναι: 0, 5, 10, 30 min. Μετά τα 15 πρώτα λεπτά στις αντιδράσεις προστίθενται κατάλληλη συγκέντρωση ενζύμου και φωτομετρείται μετά από πολύ ήπια ανάδευση ($t=0\text{min}$).

Μετά το τέλος της αντίδρασης, το πέρας δηλαδή των 30 min, υπολογίζονται οι διαφορές των απορροφήσεων μεταξύ των τυφλών σε $t=0\text{min}$ 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(A) σχεδιάζονται τα διαγράμματα ταχύτητας προς συγκέντρωση υποστρώματος, Lineweaver –Burk (διπλού αντιστρόφου) και υπολογίζονται οι τιμές K_M και V_{max} .

ΠΙΝΑΚΑΣ XV. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΣΩΛΗΝΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

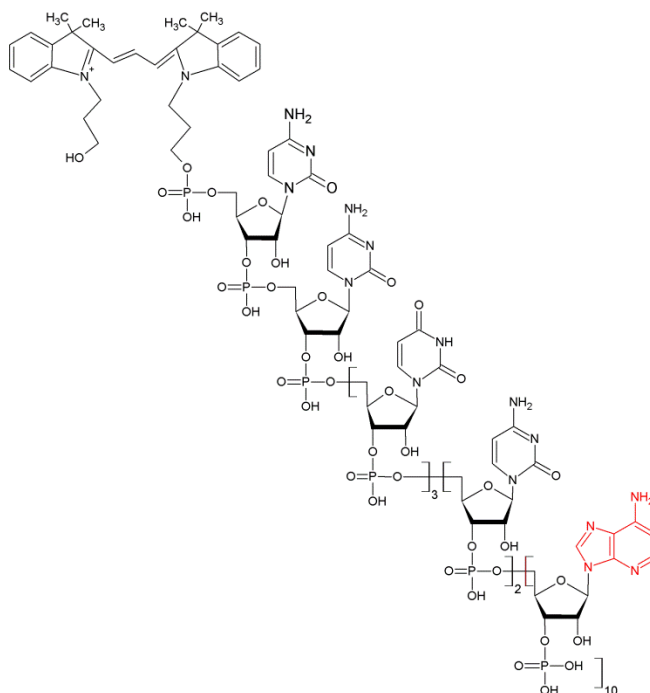
	Αντίδραση	
	T	E
Υπόστρωμα (μg/mL)		2-9
MM		(100-[S]-E)
Hesp	-	[S] _{min} /5
Met. Blue 0.0012% (μL)	900	900

Η αντίδραση γίνεται για τουλάχιστον 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος. Η συγκέντρωση ενζύμου είναι οπωσδήποτε 5 φορές μικρότερη από την ελάχιστη συγκέντρωση υποστρώματος που χρησιμοποιείται. MM: Master Mix το διάλυμα αντίδρασης, 0,1U RNasin και 0,25mM DTT. T: αντίδραση ελέγχου (τυφλό), E: αντίδραση παρουσία ενζύμου [40]

Για τον έλεγχο ενζυμικής δραστηριότητας της AtHESP που φέρει μεταλλάξεις των υποτιθέμενων καταλυτικών αμινοξέων οι κινητικές μελέτες έγιναν όπως περιγράφηκε παραπάνω, με τη διαφορά ότι ελέγχθηκε και η πιθανότητα ανάκτησης της δραστηριότητας από το Mn(II), το οποίο προστέθηκε στο διάλυμα αντίδρασης αντί του Mg(II).

3.2.10.2 Κινητικές μελέτες φθορισμού

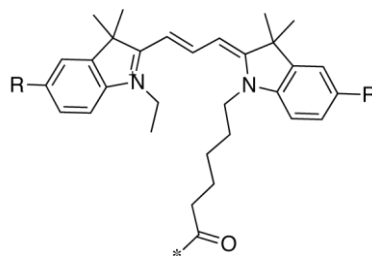
Η μέθοδος μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητας της AtHesp έγινε σύμφωνα με τους Maryati, M., et al. (2013) [77] με τροποποιήσεις. Διάφορες συγκεντρώσεις ενός 17μερούς υποστρώματος RNA (5'- CCU UUC CAA AAA AAA AA -3') που φέρει στο 5' άκρο του τη φθορίζουσα χρωστική CY3 ομοιοπολικά συνδεδεμένη με το υπόστρωμα επωάστηκαν με το ένζυμο. Η αντίδραση συνέβη στους 25°C και τερματίστηκε σε διαφορετικά χρονικά σημεία. Το ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης ήταν το ίδιο που χρησιμοποιήθηκε και για τις χρωματομετρικές κινητικές μελέτες (βλ. 3.1.7.13). Η αντίδραση τερματίστηκε με την πρόσθεση 2x ρυθμιστικού διαλύματος δειγμάτων RNA και θέρμανση στους 85°C για 3min. Ένα τμήμα της αντίδρασης αναλύθηκε σε πηκτή ακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος έγινε με τη χρήση λευκού φωτός και χρήση του φίλτρου ανίχνευσης του φθορισμού της χρωστικής CY3 του μηχανήματος αρχειοθέτησης Uvitec Alliance 4 (Cambridge) του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Λάρισα).



Εικόνα 13. Το 5'Cy3-RNA. Η αλληλουχία μετά τη Cy3 είναι η 5'- CCU UUC CAA AAA AAA AA -3', με αγκύλες φαίνονται τα πολλαπλάσια της κάθε βάσης. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται η αδενίνη.

Η χρωστική Cy3¹⁰ (βλ. Εικόνα 14) ανήκει στις κυανίνες που είναι μόρια που περιέχουν μια γέφυρα πολυμεθυνίου μεταξύ δυο ατόμων άνθρακα με απεντοπισμένο φορτίο (βλ. **Error! Reference source not found.**). Εξαιτίας της δομής τους, οι κυανίνες έχουν εξαιρετικά υψηλό συντελεστή απόσβεσης. Διαφορετικοί υποκαταστάτες επιτρέπουν τον έλεγχο των ιδιοτήτων του χρωμοφόρου, όπως η φωτοσταθερότητα και ο φθορισμός. Υπάρχουν δυο είδη κυανινών: οι σουλφιδιωμένες και οι μη σουλφιδιωμένες κυανίνες. Επειδή τα φάσματα των δυο χρωστικών είναι σχεδόν ταυτόσημα, στις περισσότερες εφαρμογές είναι ανταλλάξιμες. Και τα δυο είδη κυανινών χρησιμοποιούνται για τη σήμανση βιομορίων όπως RNA, DNA και πρωτεΐνες. Η διαφορά των δυο χρωστικών έγκειται στη διαλυτότητά τους. Οι πιο διαδεδομένες μη σουλφιδιωμένες χρωστικές είναι οι Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, and Cy7.5.

¹⁰Cy3: Το Cy αντιπροσωπεύει το Cyanine (κυανίνη) και το ψηφίο μετά από το όνομα αντιπροσωπεύει πόσοι άνθρακες παρεμβάλλονται στις ινδολικές ομάδες



Εικόνα 14. Η χρωστική Cy3

3.2.10.3 Ανάλυση αποτελεσμάτων κινητικής

Πολλά ένζυμα είναι ολιγομερή και αποτελούνται από διακριτές υπομονάδες. Συχνά οι υπομονάδες είναι ταυτόσημες και η κάθε μία διαθέτει καταλυτικό κέντρο. Αν τα κέντρα είναι ταυτόσημα και εντελώς ανεξάρτητα μεταξύ τους, τότε η παρουσία υποστρώματος στο ένα κέντρο δεν θα έχει καμία επίδραση των ιδιοτήτων πρόσδεσης των κενών κέντρων ή στις καταλυτικές δραστηριότητες των άλλων κατειλημμένων κέντρων. Αυτά τα ένζυμα σχηματίζουν καμπύλες υπερβολής. Σε αντίθετη περίπτωση, όπου η αλλαγή ενός μορίου υποστρώματος επιφέρει δομικές ή ηλεκτρονιακές αλλαγές οι οποίες οδηγούν σε διαφορετική αγκιστεία στα κενά κέντρα πρόσδεσης, τότε, η ταχύτητα δεν ακολουθεί την κινητική των *Henry-Michaelis-Menten* και η καμπύλη της ταχύτητας είναι σιγμοειδής.

Το φαινόμενο όπου η πρόσδεση ενός μορίου υποστρώματος διευκολύνει την πρόσδεση ενός ακόμη μορίου υποστρώματος αυξάνοντας την αγκιστεία των κέντρων πρόσδεσης, ονομάζεται θετική συνέργεια. Δηλαδή, n μόρια ενός ενζύμου με ένα κέντρο συμπεριφέρονται το ίδιο με ένα μόριο ενός ενζύμου με n κέντρα. Παρότι μπορεί να μην υπάρχουν σαφείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κέντρων τα απομονωμένα μονομερή είναι συχνά τελείως μη δραστηκά. Ο ολιγομερισμός μπορεί να συνεισφέρει και στην σταθερότητα των ενζύμων *in vivo*. Αν η ύπαρξη υποστρώματος σε ένα κέντρο επηρεάζει την προσδέση υποστρώματος στα κέντρα ή την ταχύτητα σχηματισμού του προϊόντος, τότε έχουμε μια κατάσταση όπου το ίδιο το υπόστρωμα δρα ως τροποποιητής οδηγώντας στην ενεργοποίηση από το υπόστρωμα ή την αναστολή από το υπόστρωμα.

Η σιγμοειδής καμπύλη του διαγράμματος v -[S] υποδεικνύουν θετική συνέργεια και είναι ενδεικτική αλλοστερικής συμπεριφοράς ενζύμων με πολλαπλά καταλυτικά κέντρα. θετικής συνέργειας. Κατόπιν, έγινε ανάλυση των κινητικών δεδομένων ώστε να υπολογιστεί ο αριθμός πιθανών κέντρων πρόσδεσης n με τους εξής τρεις τρόπους:

- i. Σχηματίστηκε το διάγραμμα Lineweaver-Burk, όπου για τα αλλοστερικά ένζυμα παράγεται μια καμπύλη αντί για την ευθεία που είναι το σύνθησης. Η καμπύλη αυτή, μπορεί να γίνει ευθεία εάν το κλάσμα $1/[S]$ υψωθεί σε διάφορες δυνάμεις. Η τιμή του n των πιθανών κέντρων πρόσδεσης είναι η δύναμη η οποία αποδίδει ευθεία γραμμή στο διάγραμμα $1/v$

προς $1/[S]^n$. Σημειώνεται πως αυτή η προσέγγιση καταδεικνύει τον ελάχιστο αριθμό πιθανών κέντρων σύνδεσης. Σύμφωνα με αυτό το διάγραμμα, υπολογίστηκαν οι βασικές κινητικές παράμετροι του ενζύμου [40, 78].

- ii. Σχηματίστηκε το διάγραμμα *Hill*, δηλαδή η γραφική παράσταση του $\log[v/V_{max}-v]$ προς $\log[S]$. Στο διάγραμμα αυτό υπολογίζεται η κλίση της ευθείας της γραφικής παράστασης (n_H). Οι τιμές $n_H > 1$ υποδεικνύουν θετική συνέργεια κατά την ενζυμική αντίδραση, ενώ τιμές $n_H < 1$ υποδεικνύουν αρνητική συνέργεια. Όταν πρόκειται για ένζυμο με ισχυρή θετική συνέργεια η τιμή n_H τείνει να υποδεικνύει τον αριθμό των κέντρων πρόσδεσης του υποστρώματος, υποδεικνύοντας πως ο αμέσως επόμενος ακέραιος αντιπροσωπεύει τον ελάχιστο αριθμό κέντρων. Όταν, δηλαδή, τα πειραματικά δεδομένα αποδίδουν $n_H = 1,8$ από την εξίσωση του *Hill* (βλ. Εξίσωση 1), προκύπτει όντως πως το ένζυμο συμπεριφέρεται να έχει ακριβώς 1,8 κέντρα σύνδεσης με πολύ ισχυρή συνέργεια. Από αυτό το αποτέλεσμα, γνωρίζουμε πως το ένζυμο έχει τουλάχιστον 2 κέντρα σύνδεσης με σχετικά ισχυρή συνέργεια [78].

$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{[S]^n}{K' + [S]^n}$$

Εξίσωση 1. Η εξίσωση του Hill

- iii. Το σχήμα της καμπύλης του διαγράμματος $v-[S]$ μπορεί να εκφραστεί με το λόγο της συγκέντρωσης υποστρώματος που απαιτούνται σε δυο οποιαδήποτε κλάσματα της V_{max} , για παράδειγμα $0,9V_{max}$ και $0,1V_{max}$. Αυτός ο λόγος εξαρτάται από την τιμή n και υπολογίζεται από την Εξίσωση 2.

$$n = \frac{\log 81}{\log \frac{[S]_{0.9}}{[S]_{0.1}}}$$

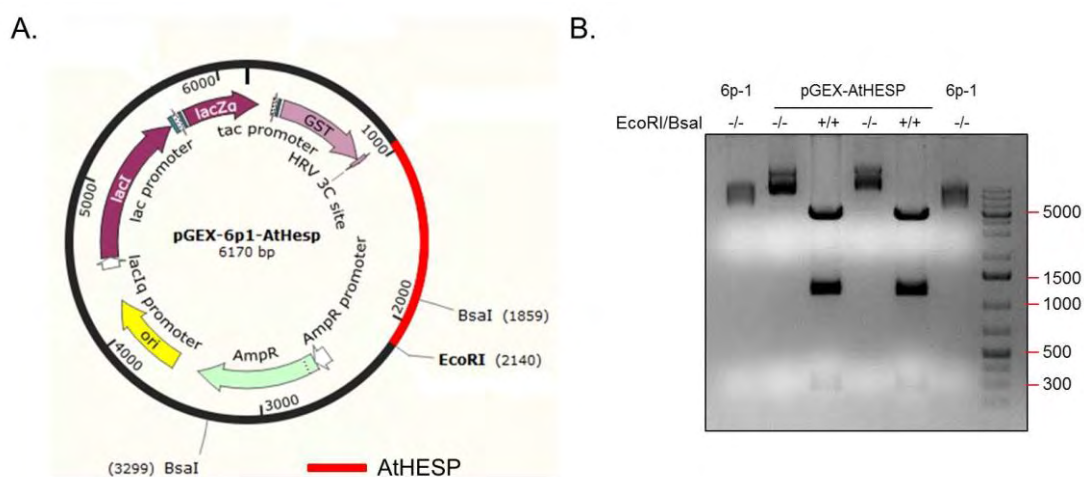
Εξίσωση 2.

Παρόλα αυτά, επειδή η καμπύλη της ταχύτητας είναι κυρτή στην περιοζή μεταξύ $0,9V_{max}$ και $0,1V_{max}$, υπολογίζεται ο παράγοντας n από την κλίση του διαγράμματος του *Hill* όταν $v = V_{max}$ [40, 78].

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Υποκλωνοποίηση cDNA αλληλουχίας της AtHESP με τη μέθοδο In-fusion HD Cloning

Η κατασκευή του φορέα pGEX-6p-1- AtHESP, ήτοι pGEX-AtHESP (βλ. Εικόνα 15, Α), κατασκευάστηκε όπως περιγράφηκε παραπάνω (βλ. 3.2.1). Ο έλεγχος της ορθότητας της κατασκευής έγινε με υποβολή του πλασμιδίου σε πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, όπως περιγράφεται αναλυτικότερα στην παράγραφο 0. Τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης συγκέντρωσης 1,5% w/v και το πρότυπο μετανάστευσης των τμημάτων DNA που προέκυψαν από την πέψη έγιναν ορατά με τη χρήση πλάκας εκπομπής υπεριώδους φωτός (Ultra violet light), όπως φαίνονται στην Εικόνα 15, Β. Πιο συγκεκριμένα, προστέθηκε στο βοθρίο της αгарόζης μη ανασυνδυασμένος φορέας που δεν υπέστη πέψη από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες, στη συνέχεια προστέθηκε ανασυνδυασμένος φορέας, ήτοι pGEX-AtHESP ο οποίος δεν υπέστη πέψη από περιοριστικά ένζυμα, επίσης, προστέθηκε pGEX-AtHESP που υπέστη πέψη και με τις δυο περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Τέλος, προστέθηκε ο δείκτης μοριακών μαζών. Να σημειωθεί ότι, η αντίδραση πέψης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες έγινε εις διπλούν για τον ανασυνδυασμένο φορέα. Αφού ταυτοποιήθηκε η ορθότητα της κατασκευής, αλλά και του ενθέματος, καθώς διέθετε την αναμενόμενη θέση περιορισμού, ο ανασυνδυασμένος φορέας αλληλουχήθηκε από την εταιρία Cemia A.E. (Λάρισα).



Εικόνα 15. Α. Ο ανασυνδυασμένος φορέας pGEX-AtHESP όπου επισημαίνονται οι θέσεις αναγνώρισης από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI και BsaI, κόκκινο: το τμήμα εκείνο στο φορέα που αντιστοιχεί στο cDNA της AtHesp. Β. Πηκτή αгарόζης μετά από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των αντιδράσεων διπλής πέψης, 6p-1: μη ανασυνδυασμένος φορέας, -/-: απουσία περιοριστικών ενδονουκλεασών, δηλ. δεν συνέβη αντίδραση πέψης, +/+ : παρουσία και των δυο περιοριστικών ενδονουκλεασών (EcoRI, BsaI), δηλ. αντίδραση διπλής πέψης.

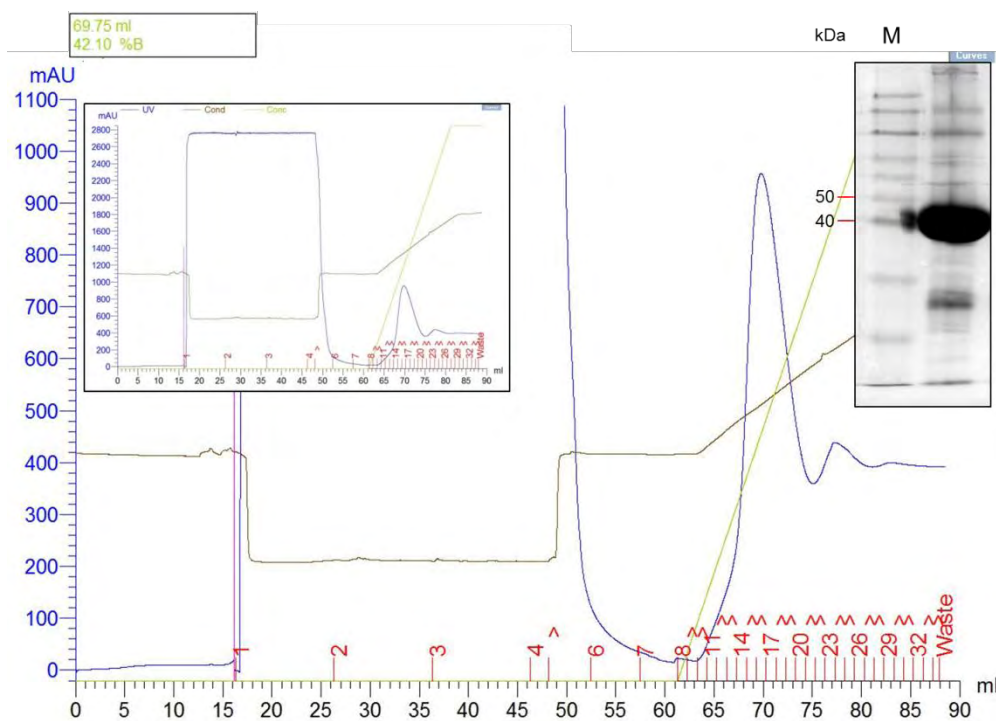
4.2 Βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου απομόνωσης της AtHESP

4.2.1 Υπερέκφραση της 6xHis-AtHESP

4.2.1.1 Υπερέκφραση από το φορέα pET-15b

4.2.1.1.1 AtHESP

Η απομόνωση της AtHESP με χρωματογραφία αχιστείας ακινητοποιημένων μετάλλων έγινε όπως περιγράφηκε παραπάνω (βλ. 3.2.8, 3.2.9.4). Η έκλυση της πρωτεΐνης από τη στήλη έγινε με βαθμίδωση συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης κατά 5%, δηλαδή αύξηση της συγκέντρωσης του ιμιδαζολίου 5% ανά mL, δηλαδή κατά 35mM ιμιδαζολίου ανά mL. Με τη βοήθεια του λογισμικού Unicorn (Amersham) λήφθηκε η εικόνα του χρωματογραφήματος (βλ. Εικόνα 16).

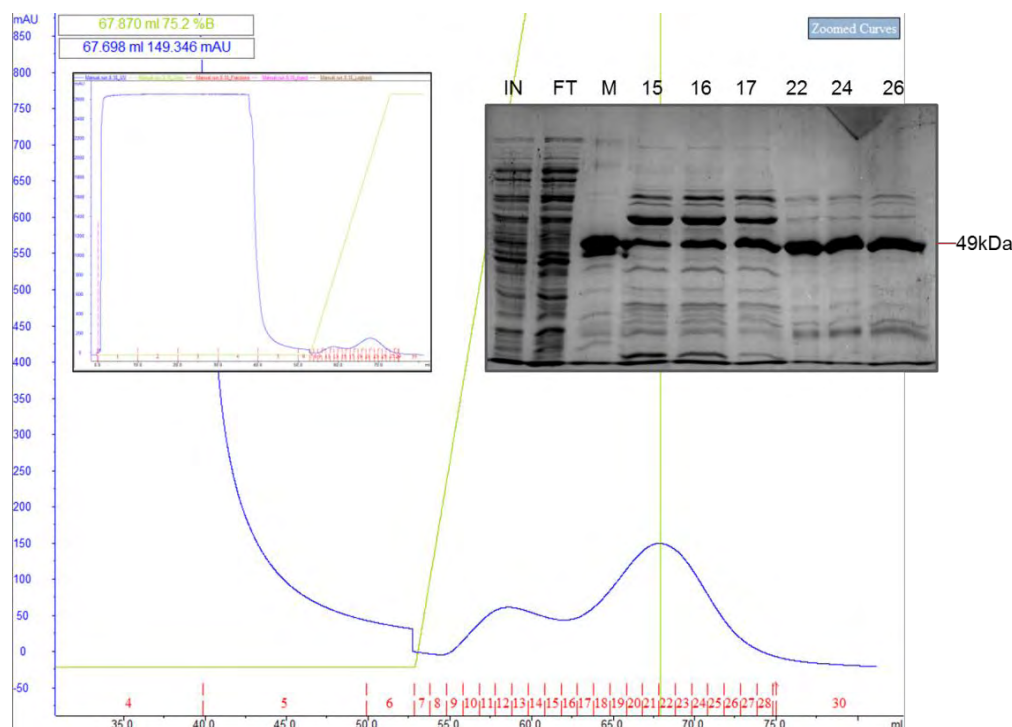


Εικόνα 16. Χρωματογράφημα από τη στήλη νικελίου (HisTrapHP, GE) της πρωτεΐνης AtHESP. **Ένθετο (αριστερά):** εικόνα του συνόλου της χρωματογραφίας αχιστείας χωρίς μεγέθυνση. **Ένθετο (δεξιά):** Ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πυκνότητας 10%. Αριστερά φαίνονται οι δείκτες μοριακής μάζας.

4.2.1.1.2 AtHESP (E114A)

Η δημιουργία της AtHESP η οποία φέρει μετάλλαξη στη θέση 114 του καταλοίπου γλουταμικού με αλανίνη δημιουργήθηκε όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 3.2.5.2. Η διαδικασία που ακο-

λουθήθηκε για την απομόνωση είναι πανομοιότυπη με τη διαδικασία απομόνωσης της AtHESP, χωρίς τροποποιήσεις.

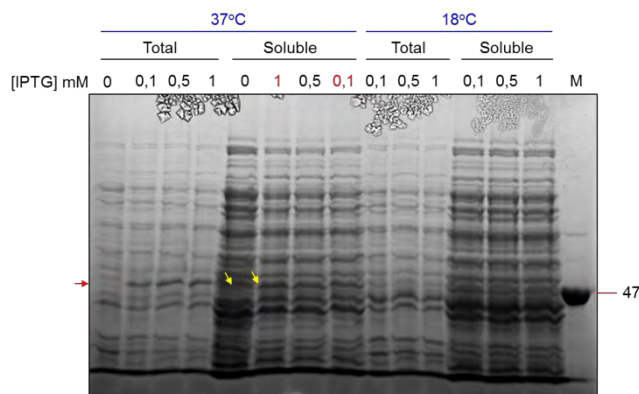


Εικόνα 17. Χρωματογράφημα από τη στήλη νικελίου (HisTrapHP, GE) της πρωτεΐνης AtHESP-E114A. Ένθετο (αριστερά): εικόνα του συνόλου της χρωματογραφίας αχχιστείας χωρίς μεγέθυνση. **Ένθετο (δεξιά):** Ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πυκνότητας 10%. I: Υπερκείμενο μετά τη λύση των βακτηριακών κυττάρων και φυγοκέντρηση, FT: Υπερδιήθημα- πρωτεΐνες που δεν προσδέθηκαν στη στήλη και εκπλύθηκαν από αυτή, 15-17: κλάσμα έκπλυσης, 24-26: έκλουση με βαθμιδωση συγκέντρωσης αυξανόμενη 5%/mL, M: Δείκτης μοριακών μαζών (AtHESP).

4.2.1.2 Υπερέκφραση από το φορέα pATHRA

4.2.1.2.1 Εξέταση συνθηκών έκφρασης

Με σκοπό την απομόνωση της AtHESP από το φορέα pATHRA σε μεγάλη κλίμακα, προηγήθηκε η εξέταση διαφόρων συνθηκών ανάπτυξης της βακτηριακής καλλιέργειας. Έγινε έλεγχος του προτύπου έκφρασης σε βακτήρια E.coli του στελέχους BL21-Gold (DE3) σύμφωνα με τη μέθοδο που αναφέρθηκε παραπάνω (βλ. 3.2.6.1). Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη (AtHESP) αναμένεται να έχει την ίδια μοριακή μάζα όπως προηγουμένως, εφόσον δε φέρει κάποια μετάλλαξη.

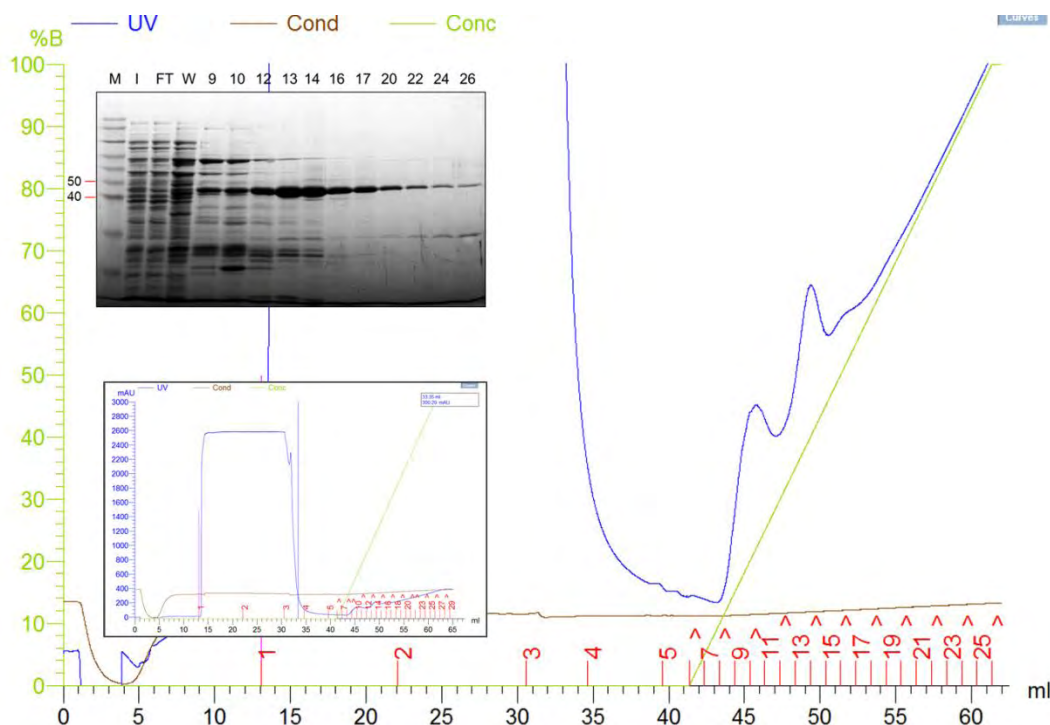


Εικόνα 18. Ανάλυση σε ηλεκτική πολυακρυλαμιδίου του προτύπου έκφρασης της πρωτεΐνης GST-AtHESP από βακτήρια *E.coli*, στελέχους BL21-Gold (DE3) και επαγωγή της υπερέκφρασης στους 37°C και 18 °C σε διάφορες συγκεντρώσεις IPTG. M: δείκτης μοριακών μαζών, AtHESP. Κίτρινα βέλη: διαφορές στην επαγωγή της AtHESP στις διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG στα διαλυτά δείγματα, κόκκινο βέλος: διαφορά στην επαγωγή της AtHESP στις διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG στα δείγματα μετά τη μηχανική λύση με υπερήχους

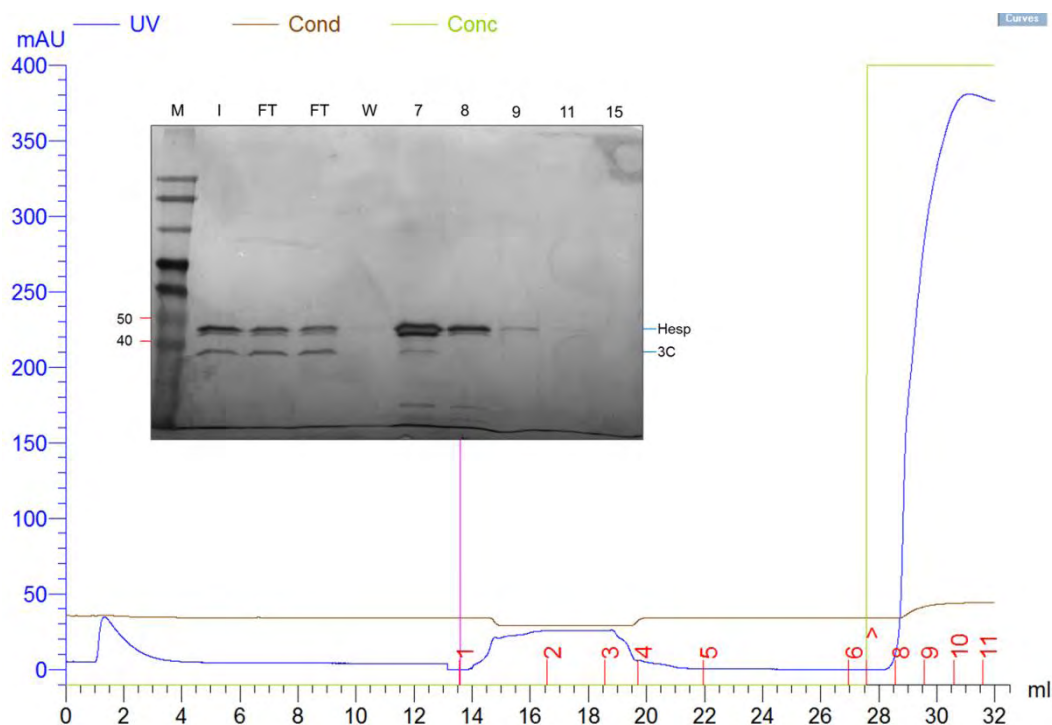
4.2.1.2.2 Απομόνωση της AtHESP με το σύστημα FPLC

Η απομόνωση της AtHESP με στήλη χρωματογραφίας αγχιστείας ακινητοποιημένων μετάλλων (βλ. 3.2.9.4) έγινε κατόπιν υπερέκφρασης της από βακτήρια (βλ. 3.2.8) Η έκλουση της πρωτεΐνης από τη στήλη έγινε με βαθμίδωση συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης κατά 5%, δηλαδή αύξηση της συγκέντρωσης του ιμιδαζολίου 5% ανά mL, δηλαδή κατά 35mM ιμιδαζολίου ανά mL. Με τη βοήθεια του λογισμικού Unicorn (Amersham) λήφθηκε η εικόνα του χρωματογραφήματος (βλ.Εικόνα 19).

Τα κλάσματα που περιείχαν την πρωτεΐνη προς μελέτη (AtHESP), συλλέχθηκαν και επωάστηκαν με την πρωτεάση 3C η οποία είναι ειδική για την τμήση της σηματοδοτικής ετικέτας όπως αναφέρθηκε παραπάνω (βλ. 3.2.9.3). Ο έλεγχος της επιτυχίας της πέψης της πρωτεΐνης προς μελέτη από την πρωτεάση 3C έγινε με ένα επιπλέον βήμα καθαρισμού, καθώς η πρωτεάση και η πρωτεΐνη που έχει υποστεί επιτυχή πέψη δεν έχουν αγχιστεία για τη στήλη. Αυτό το στάδιο καθαρισμού γίνεται ακριβώς όπως και το προηγούμενο, με τη μόνη διαφορά πως σε αυτό το βήμα συλλέγεται το υπερδιήθημα (Flow-through), στο οποίο περιέχεται η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος η οποία πλέον δεν εμφανίζει αγχιστεία με τη στήλη και εκπλαίνεται χωρίς να αλληλεπιδρά με αυτή (βλ. Εικόνα 20).



Εικόνα 19. Χρωματογράφημα στήλης νικελίου (HisTrapHP, GE). Η κόκκινη κάθετος αντιπροσωπεύει την εισαγωγή δείγματος πρωτεϊνών στη στήλη. Η πράσινη κάθετος καταδεικνύει την αρχή της έκλουσης της πρωτεΐνης. **Ένθετο πάνω:** Ανάλυση των εκλουσμένων πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου. I: υπερκείμενο μετά τη λύση των κυττάρων, FT: υπερδιήθημα, M: δείκτης μοριακών μαζών, οι αριθμοί στις διαδρομές αντιστοιχούν στην αρίθμηση των κλασμάτων έκλουσης. **Ένθετο κάτω:** εικόνα του συνόλου της χρωματογραφίας αχιστείας χωρίς μεγέθυνση.

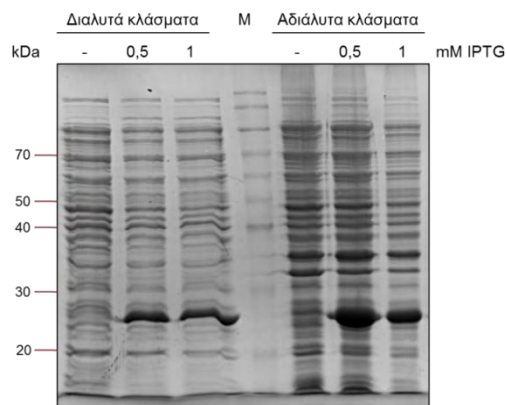


Εικόνα 20. Χρωματογράφημα στήλης νικελίου (HisTrap HP, GE) αφαίρεσης σηματοδοτικής ετικέτας (6xHis). Η κόκκινη κάθετος αντιπροσωπεύει την εισαγωγή δείγματος πρωτεϊνών στη στήλη. Η πράσινη κάθετος καταδεικνύει την αρχή της έκλουσης της πρωτεΐνης. **Ένθετο πάνω:** Ανάλυση των εκλουσμένων πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου πυκνότητας 8%. I: δείγμα πρωτεΐνης μετά την πέψη με 3C πρωτεάση, FT: υπερδιήθημα, M: δείκτης μοριακών μαζών, οι αριθμοί στις διαδρομές αντιστοιχούν στην αρίθμηση των κλασμάτων έκλουσης.

4.2.2 Υπερέκφραση της GST-AtHESP

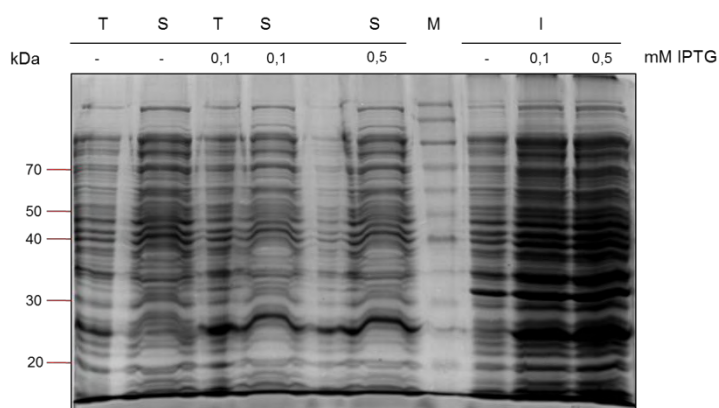
4.2.2.1 Εξέταση συνθηκών έκφρασης GST-AtHESP

Με σκοπό την απομόνωση της GST-AtHESP σε μεγάλη κλίμακα, προηγήθηκε η εξέταση διαφόρων συνθηκών ανάπτυξης της βακτηριακής καλλιέργειας. Αρχικά, έγινε έλεγχος του προτύπου έκφρασης σε βακτήρια *E. coli* του στελέχους BL21-Gold (DE3) σύμφωνα με τη μέθοδο που αναφέρθηκε παραπάνω (βλ. 3.2.6.1). Συνοπτικά, καλλιέργειες των 5mL επωάστηκαν έως ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας ήταν $OD_{600nm} = 0,7$ όπου και έγινε η προσθήκη του επαγωγέα (IPTG) σε διάφορες συγκεντρώσεις (βλ. Εικόνα 21). Στη συνέχεια, οι καλλιέργειες επωάστηκαν για επιπλέον 4h στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (210rpm). Τέλος, έγινε λύση των κυττάρων (βλ. 3.2.9) και ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου πυκνότητας 10%, έως ότου το μέτωπο των χρωστικών ηλεκτροφόρησης να πλησιάσει το τέλος της πηκτής. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη (GST-AtHESP) αναμένεται να έχει μοριακή μάζα 72kDa, καθώς απαρτίζεται από την AtHESP (47kDa) [40] και την S-τρασφεράση της γλουταθειόνης που είναι μια πρωτεΐνη με μοριακή μάζα 26kDa [44].



Εικόνα 21. Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου του προτύπου έκφρασης της πρωτεΐνης GST-AtHESP από βακτήρια *E.coli*, στελέχους BL21-Gold (DE3) και επαγωγή της υπερέκφρασης στους 37°C. M: δείκτης μοριακών μαζών

Συνεχίζοντας την εξέταση των βέλτιστων συνθηκών υπερέκφρασης, εξετάσθηκε στο ίδιο βακτηριακό στέλεχος, η επαγωγή της υπερέκφρασης σε χαμηλότερη θερμοκρασία (25°C) και με μικρότερες συγκεντρώσεις επαγωγέα για περισσότερες ώρες (16-18h) υπό συνεχή ανάδευση (210rpm). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν ίδια όπως παραπάνω, με την εξαίρεση πως οι συγκεντρώσεις του επαγωγέα ήταν χαμηλότερες (βλ.Εικόνα 22).



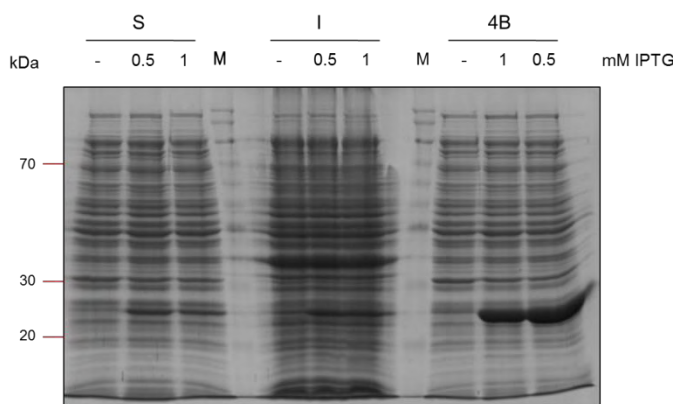
Εικόνα 22. Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου του προτύπου έκφρασης της πρωτεΐνης GST-AtHESP από βακτήρια *E.coli*, στελέχους BL21-Gold (DE3) και επαγωγή της υπερέκφρασης στους 25°C. M: δείκτης μοριακών μαζών, T: δείγμα μετά τη λύση των κυττάρων, πριν τη φυγοκέντρηση, I: Αδιάλυτα κλάσματα

4.2.2.2 Εξέταση συνθηκών έκφρασης και μεσαίας κλίμακας καθαρισμός GST-AtHESP

Στην προσπάθεια να εντοπιστούν οι βέλτιστες συνθήκες υπερέκφρασης της GST-AtHESP, εξετάσθηκαν δυο ακόμη βακτηριακά στελέχη της *E.coli*, τα B834 (DE3) και τα Rosetta 2, με τη μέθοδο που περιγράφηκε παραπάνω (βλ. 3.2.6.1) και κατόπιν ακολούθησε χρωματογραφικός καθαρισμός μεσαίας κλίμακας της GST-AtHESP με σφαιρίδια σεφαρόζης- γλουταθειόνης όπως περιγράφηκε πα-

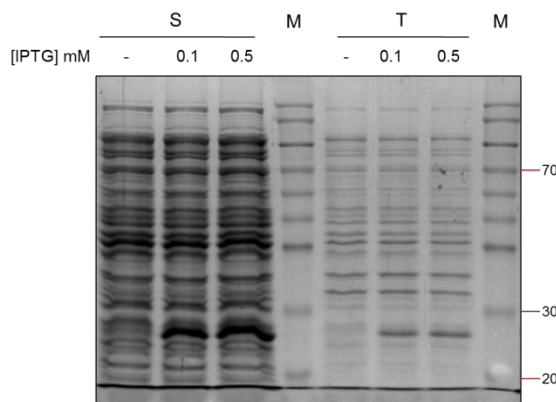
ραπάνω (βλ. 3.2.6.3). Τέλος, το πρότυπο πρωτεϊνών αναλύθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Η πυκνότητα της πηκτής που χρησιμοποιήθηκε ήταν 10%.

Πιο συγκεκριμένα, στο βακτηριακό στέλεχος B834 (DE3) εξετάσθηκε το πρότυπο έκφρασης στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (210rpm) μετά από προσθήκη επαγωγέα σε διάφορες συγκεντρώσεις (0, 0.5, 1 mM IPTG) και επαγωγή της υπερέκφρασης για 4h. Τα δείγματα αναμίχθηκαν με το χρωματογραφικό μέσο, ώστε να ελεγχθεί εάν πρωτεΐνη προς μελέτη είναι παρούσα και εάν προσδένεται στο υλικό (βλ. Εικόνα 23).

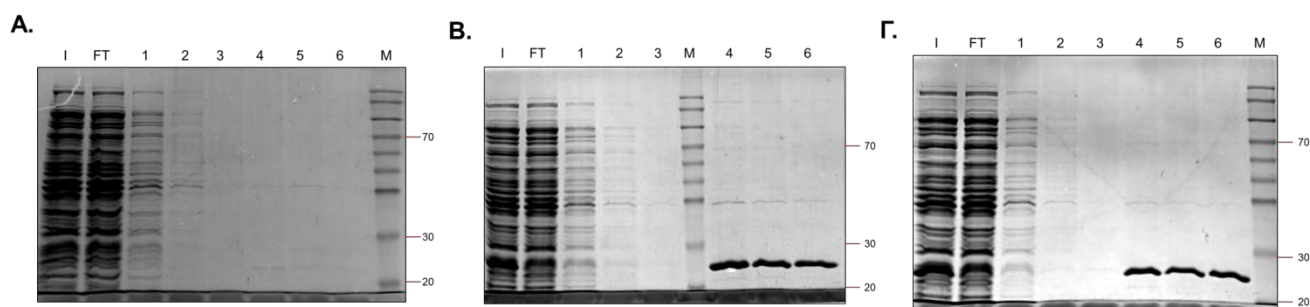


Εικόνα 23. Ανάλυση σε πηκτή ακρυλαμιδίου του προτύπου έκφρασης της πρωτεΐνης GST-AtHESP από βακτήρια *E.coli*, στελέχους B834 (DE3) και επαγωγή της υπερέκφρασης στους 37°C. M: δείκτης μοριακών μαζών, 4B: τα δείγματα που επώαστηκαν με το χρωματογραφικό μέσο GST-4B Sepharose.

Κατόπιν, ελέγχθηκε το πρότυπο έκφρασης στους 18°C υπό συνεχή ανάδευση (210rpm) μετά από προσθήκη επαγωγέα σε διάφορες συγκεντρώσεις (0, 0.1, 0.5 mM IPTG) και επαγωγή της υπερέκφρασης για 16-18h (βλ. Εικόνα 24). Στη συνέχεια, αφού έγινε λύση των κυττάρων, το κυτταρόλυμα αναμίχθηκε με το χρωματογραφικό μέσο GST-4B Sepharose και ακολούθησε η διαδικασία καθαρισμού μεσαίας κλίμακας, όπως περιγράφεται παραπάνω (βλ. 3.2.6.3). Κατόπιν, ακολούθησε η ανάλυση των κλασμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου πυκνότητας 10% (βλ. Εικόνα 25).

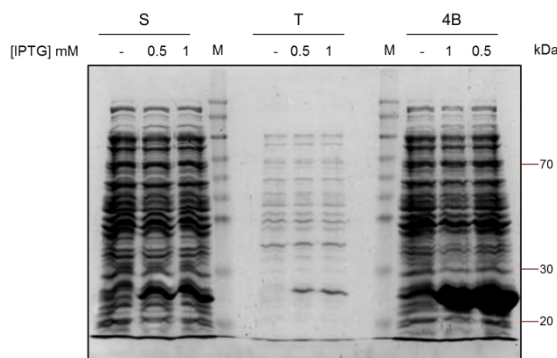


Εικόνα 24. Ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου του προτύπου έκφρασης της πρωτεΐνης GST-AtHESP από βακτήρια *E.coli*, στελέχους B834 (DE3) και επαγωγή της υπερέκφρασης στους 18°C. M: δείκτης μοριακών μαζών



Εικόνα 25. Μεσαιάς κλίμακας καθαρισμός της πρωτεΐνης GST-AtHESP από βακτήρια *E.coli*, στελέχους B834 (DE3) και επαγωγή της υπερέκφρασης στους 18°C. **A.** Μεσαιάς κλίμακας καθαρισμός απουσία επαγωγέα (0mM IPTG), **B.** Μεσαιάς κλίμακας καθαρισμός παρουσία 0,1mM επαγωγέα, **Γ.** Μεσαιάς κλίμακας καθαρισμός παρουσία 0,5mM επαγωγέα I: υπερκείμενο μετά τη λύση των κυττάρων, FT: υπερδιήθημα, 1-3: κλάσματα έκλουσης, 4-6: κλάσματα έκλουσης, M: δείκτης μοριακών μαζών

Τέλος, εξετάστηκε το στέλεχος Rosetta 2. Πιο συγκεκριμένα, στο βακτηριακό στέλεχος Rosetta 2 εξετάστηκε το πρότυπο έκφρασης στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (210rpm) μετά από προσθήκη επαγωγέα σε διάφορες συγκεντρώσεις (0, 0.5, 1 mM IPTG) και επαγωγή της υπερέκφρασης για 4h. Τα δείγματα αναμίχθηκαν με το χρωματογραφικό μέσο, ώστε να ελεγχθεί εάν πρωτεΐνη προς μελέτη είναι παρούσα και εάν προσδένεται στο υλικό (βλ. Εικόνα 26)



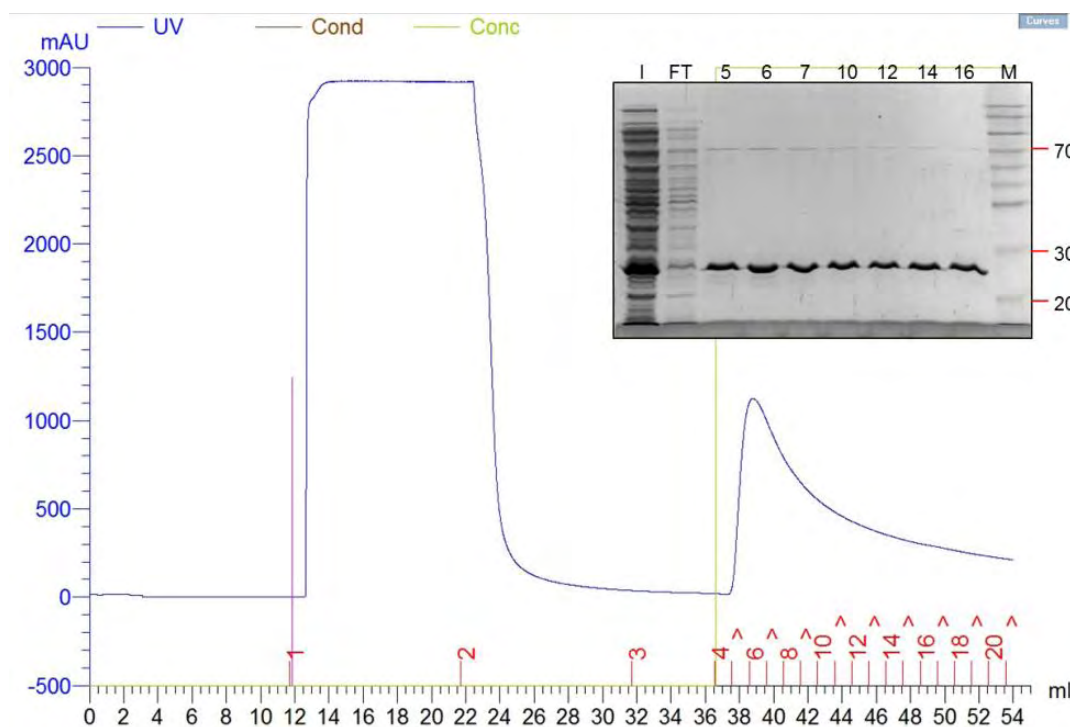
Εικόνα 26. Ανάλυση σε ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου του προτύπου έκφρασης της πρωτεΐνης GST-AtHESP από βακτήρια *E.coli*, στελέχους Rosetta 2 και επαγωγή της υπερέκφρασης στους 37°C. Μ: δείκτης μοριακών μαζών, 4B: τα δείγματα που επώαστηκαν με το χρωματογραφικό μέσο GST-4B Sepharose.

4.2.2.3 Απομόνωση της GST-AtHESP με το σύστημα FPLC

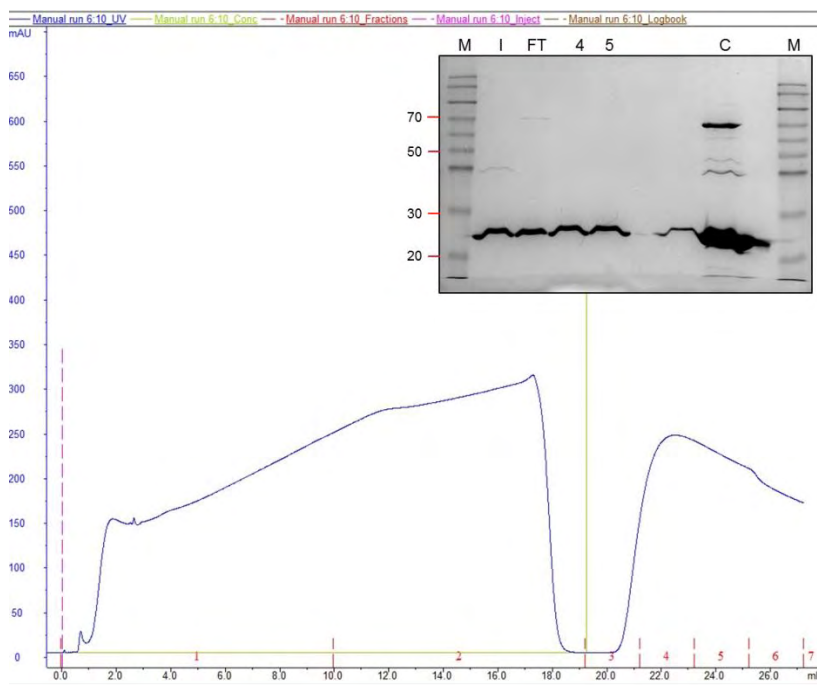
Επιχειρήθηκε η απομόνωση της GST-AtHESP με το σύστημα FPLC με τη στήλη αγκιστείας GST-4B Protino όπως περιγράφηκε παραπάνω (βλ. 3.2.9.2) από το βακτηριακό στέλεχος BL21- Gold (DE3). Οι διαφορές μεταξύ των διαφόρων στελεχών που εξετάστηκαν ήταν ανεπαίσθητες, οπότε επιλέχθηκε το στέλεχος ως το πιο αποδοτικό BL21- Gold (DE3). Πιο συγκεκριμένα, μια φλάσκα που περιείχε 500mL αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου LB Broth και παρουσία του αντιβιοτικού αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 1/1000, εμβολιάστηκε με όγκο 1/100 από μια ήδη ανεπτυγμένη καλλιέργεια και η πορεία της παρακολουθήθηκε φασματοφωτομετρικά έως ότου η οπτική της πυκνότητα ήταν $OD_{600nm} = 0,7 A$ όπου και έγινε η προσθήκη του επαγωγέα (IPTG). Η επαγωγή της υπερέκφρασης έγινε στους 37°C για 4h και κατόπιν συλλέχθηκε το κυτταρικό ίζημα με φυγοκέντρηση, όπως περιγράφηκε παραπάνω (βλ. 3.2.8). Στη συνέχεια, ακολούθησε η λύση των κυττάρων στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης και η συλλογή του κυτταρολύματος μετά από φυγοκέντρηση σε υψηλές στροφές. Το κυτταρόλυμα πέρασε από φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,45μm και φορτώθηκε στη στήλη. Η έκλυση της πρωτεΐνης έγινε με 100% διάλυμα έκλυσης για τη στήλη GST-4B Protino. Καθώς οι πρωτεΐνες που έχουν εκλουσθεί εξέρχονται από τη στήλη, διέρχονται από φωτόμετρο υπεριώδους που ελέγχει συνεχώς την περιεκτικότητα του εκλούσματος σε πρωτεΐνη με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος $\lambda = 280 \text{ nm}$. Η οπτική απορρόφηση καταγράφεται στο χρωματογράφημα, το οποίο οπτικοποιείται από το λογισμικό Unicorn™ (Amersham) και συλλέγονται τα κλάσματα που έχουν τη μεγαλύτερη απορρόφηση ώστε να αναλυθούν με ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου πυκνότητας 10% (βλ. Εικόνα 27).

Τα κλάσματα που περιείχαν την πρωτεΐνη προς μελέτη (GST-AtHESP) στο ύψος των 72kDa, συλλέχθηκαν και επώαστηκαν με την πρωτεάση 3C η οποία είναι ειδική για την τμήση της σηματοδοτικής ετικέτας (GST) όπως αναφέρθηκε παραπάνω (βλ. 3.2.9.3). Η αφαίρεση της ετικέτας και της

πρωτεάσης από το διάλυμα της πρωτεΐνης γίνεται με ένα επιπλέον βήμα καθαρισμού, καθώς η πρωτεάση και η ετικέτα έχουν αγχιστεία για τη στήλη. Αυτό το στάδιο καθαρισμού γίνεται ακριβώς όπως και το προηγούμενο, με τη μόνη διαφορά πως σε αυτό το βήμα συλλέγεται το υπερδιήθημα (Flow-through), στο οποίο περιέχεται η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος η οποία πλέον δεν εμφανίζει αγχιστεία με τη στήλη και εκπλαίνεται χωρίς να αλληλεπιδρά με αυτή (βλ. Εικόνα 28).



Εικόνα 27. Χρωματογράφημα στήλης αγχιστείας GST-4B Protino. Η κόκκινη κάθετος αντιπροσωπεύει την εισαγωγή δείγματος πρωτεϊνών στη στήλη. Η πράσινη κάθετος καταδεικνύει την αρχή της έκλουσης της πρωτεΐνης. **Ένθετο: Ανάλυση των εκλουσμένων πρωτεϊνών σε ηλεκτική πολυακρυλαμιδίου.** I: υπερκείμενο μετά τη λύση των κυττάρων, FT: υπερδιήθημα, M: δείκτης μοριακών μαζών, οι αριθμοί στις διαδρομές αντιστοιχούν στην αρίθμηση των κλασμάτων έκλουσης

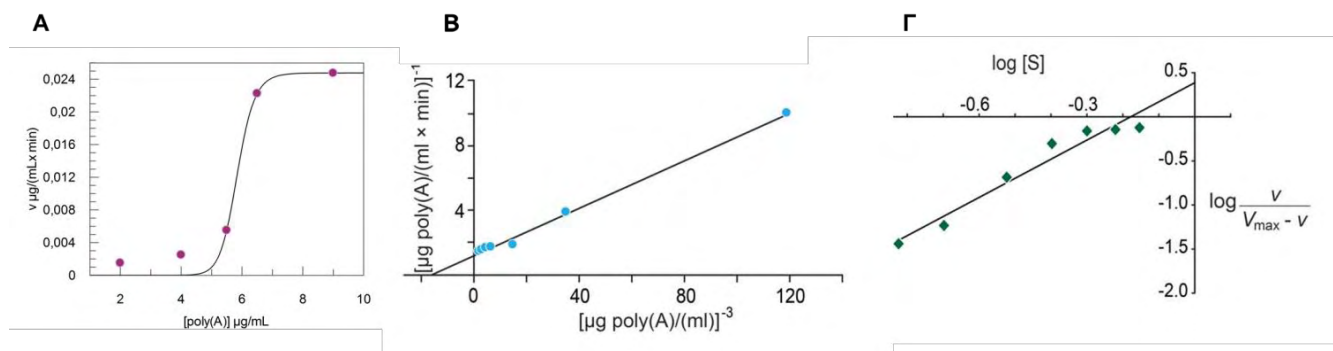


Εικόνα 28. Αφαίρεση της ετικέτας αγχιστείας. Χρωματογράφημα στήλης αγχιστείας GST-4B Protino. Η κόκκινη διακεκομμένη αντιπροσωπεύει την εισαγωγή δείγματος πρωτεϊνών στη στήλη. Η πράσινη κάθετος καταδεικνύει την αρχή της έκλουσης της πρωτεΐνης. **Ένθετο: Ανάλυση των εκλουσμένων πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.** I: υπερκείμενο μετά τη λύση των κυττάρων, FT: υπερδιήθημα, M: δείκτης μοριακών μαζών, 4-5 κλάσματα έκλουσης, C: συμπυκνωμένο κλάσμα υπερδιηθήματος μετά την αφαίρεση της ετικέτας αγχιστείας.

4.3 Κινητικές μελέτες

4.3.1 Η AtHESP είναι ένα αλλοστερικό ένζυμο

Οι χρωματομετρικές κινητικές μελέτες της AtHESP με τη μέθοδο του Methylene blue (βλ. 3.2.10.1) και η μετέπειτα ανάλυση των δεδομένων με το λογισμικό GraFit 6 [79] ώστε να σχηματιστεί η καμπύλη ταχύτητας προς υπόστρωμα, αναδεικνύουν σιγμοειδή καμπύλη (βλ. Εικόνα 29, A), χαρακτηριστική των αλλοστερικών ενζύμων με πάνω από ένα καταλυτικά κέντρα.



Εικόνα 29. Διάγραμμα ανάλυσης της ενζυμικής δραστηριότητας της AtHESP. Α. Διάγραμμα ταχύτητας προς συγκέντρωση υποστρώματος, Β. Διάγραμμα Lineweaver-Burk (διπλού αντιστρόφου), Γ. Διάγραμμα Hill [40]

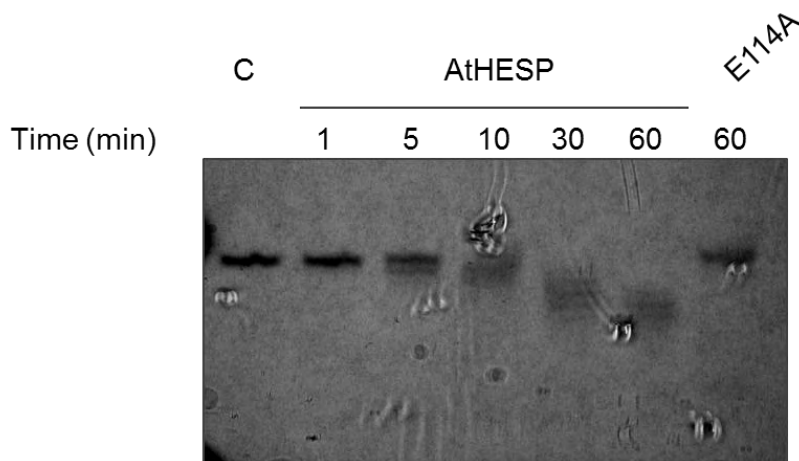
Η σιγμοειδής καμπύλη του διαγράμματος v - $[S]$ (βλ. Εικόνα 29, Α) είναι ενδεικτικό της θετικής συνέργειας. Κατόπιν, έγινε ανάλυση των κινητικών δεδομένων ώστε να υπολογιστεί ο αριθμός πιθανών κέντρων πρόσδεσης n με τους τρόπους που περιγράφηκαν στην παράγραφο 3.2.10.3.

Από το διάγραμμα Lineweaver-Burk (βλ. Εικόνα 29, Β) φαίνεται πως η ελάχιστη δύναμη που οδήγησε σε ευθεία γραμμή στο διάγραμμα διπλού αντιστρόφου ήταν $n=3$. Σημειώνεται, πως αυτή η προσέγγιση καταδεικνύει τον ελάχιστο αριθμό πιθανών κέντρων σύνδεσης. Σύμφωνα με αυτό το διάγραμμα, υπολογίστηκαν οι βασικές κινητικές παράμετροι του ενζύμου [40]. Στην Εικόνα 29, Γ, φαίνεται η γραφική παράσταση του $\log[v/(V_{\max}-v)]$ προς $\log[S]$ ή διάγραμμα Hill. Η κλίση της ευθείας της γραφικής παράστασης (n_H) ισούται με 2,2. Όταν πρόκειται για ένζυμο με ισχυρή θετική συνέργεια η τιμή n_H τείνει να υποδεικνύει τον αριθμό των κέντρων πρόσδεσης του υποστρώματος, υποδεικνύοντας πως ο αμέσως επόμενος ακέραιος ($n=3$, σε αυτή την περίπτωση) αντιπροσωπεύει τον ελάχιστο αριθμό κέντρων [78]. Τέλος, το σχήμα της καμπύλης του διαγράμματος v - $[S]$ μπορεί να εκφραστεί με το λόγο της συγκέντρωσης υποστρώματος που απαιτούνται σε δυο οποιαδήποτε κλάσματα της V_{\max} , για παράδειγμα $0,9V_{\max}$ και $0,1V_{\max}$ (βλ. Εξίσωση 2.). Αυτός ο λόγος εξαρτάται από την τιμή n . Η τιμή του n ισούται με 2,7, υποδεικνύοντας πως το ένζυμο διαθέτει τρία πιθανά κέντρα πρόσδεσης του υποστρώματος [40, 78].

4.3.2 Η μετάλλαξη συγκεκριμένων αμινοξέων μειώνει τη δραστηριότητα της AtHESP

Πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες φθορισμού για τον υπολογισμό των κινητικών σταθερών του ενζύμου της AtHESP στο οποίο δημιουργήθηκε στοχευμένη μετάλλαξη στο κατάλοιπο γλουταμινικού οξέος (E) στη θέση 114. Εξετάστηκε κατά πόσο η AtHESP-E114A έχει την ικανότητα να αποικοδομήσει το 5'CY3- RNA σε σχέση με την AtHESP που δε φέρει μετάλλαξη. Παρατηρήθηκε μείωση της δραστηριότητας της AtHESP-E114A σε σχέση με την AtHESP (βλ. Εικόνα 30). Όλες οι

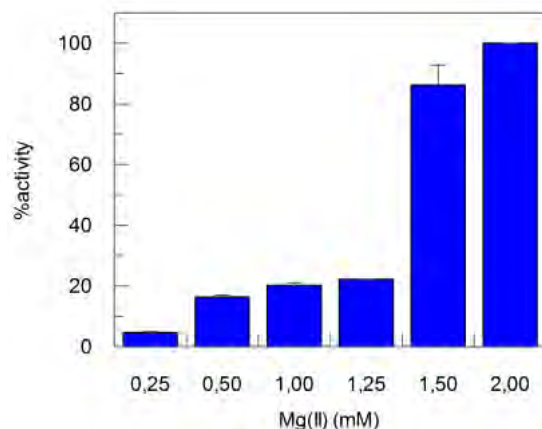
αντιδράσεις ξεκίνησαν την ίδια χρονική στιγμή, και για κάθε σημείο του χρόνου που σημειώνεται στην Εικόνα 30, οι αντιδράσεις τερματίστηκαν με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος δειγμάτων RNA 2x και επώαστηκαν για 3min στους 85°C. Κατόπιν ηλεκτροφορήθηκαν όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.7.1.2.



Εικόνα 30. Αντίδραση AtHESP στο πέρασμα του χρόνου. Ηλεκτροφόρηση 20% ακρυλαμιδίου-8M ουρίας. C: αντίδραση έλεγχος (απουσία ενζύμου), Hesp: Αντίδραση παρουσία μη μεταλλαγμένης AtHESP, E114A: αντίδραση παρουσία της μεταλλαγμένης AtHESP-E114A.

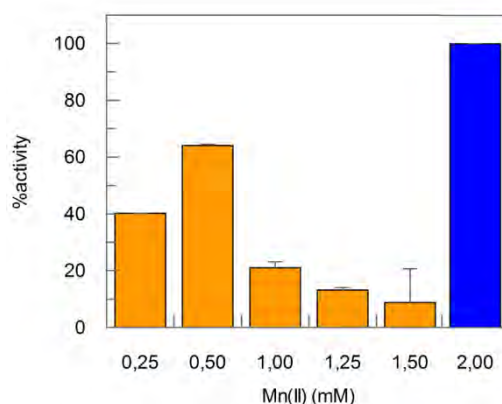
4.3.3 Αξιοποίηση ιόντων $Mg(II)$ και $Mn(II)$ από την AtHESP

Η πλειοψηφία των ενζύμων που αποικοδομούν poly(A) εξαρτώνται από την παρουσία ιόντων $Mg(II)$ για αποτελεσματική δραστηριότητα. Για την διερεύνηση της εξάρτησης της δραστηριότητας από τα ιόντα $Mg(II)$, πραγματοποιήθηκαν κινητικές δοκιμασίες με μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις $MgCl_2$ (από 0,25mM έως 2mM). Για τη συγκέντρωση $Mg(II)$ όπου παρατηρήθηκε η μέγιστη ικανότητα αποικοδόμησης poly(A) από την AtHESP (2mM $MgCl_2$ στην προκειμένη περίπτωση), αυτή η συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα αναφοράς ώστε να υπολογιστεί η επί τοις εκατό (%) δραστηριότητα της AtHESP παρουσία των υπόλοιπων συγκεντρώσεων $Mg(II)$ (βλ. Γράφημα 1) [40].

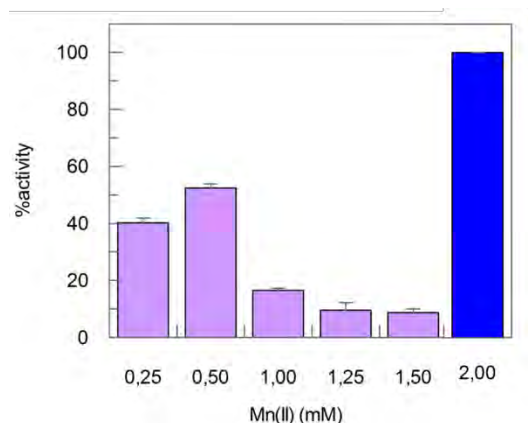


Γράφημα 1. Η δραστικότητα της AtHESP εξαρτάται από ιόντα Mg(II).

Επίσης, διερευνήθηκε κατά πόσο η AtHESP μπορεί να αξιοποιήσει τα ιόντα Mn(II) και κατά πόσο η δραστικότητα της AtHESP-E114A ανακτάται μερικώς παρουσία Mn(II) (βλ. Γράφημα 2 και Γράφημα 3). Για τις δοκιμασίες όπου χρησιμοποιήθηκε MnCl₂, ως δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε και πάλι η συγκέντρωση 2mM Mg(II). Σημειώνεται, ότι κατά την παρασκευή των αντιδράσεων, παρουσία Mg(II) και Mn(II) στο ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης δεν προστέθηκε MgCl₂ και οι αραιώσεις των διαφόρων συγκεντρώσεων του υποστρώματος έγιναν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (χωρίς MgCl₂). Παρατηρείται πως στη συγκέντρωση Mn(II) 0,5mM, η δραστικότητα της AtHESP αγγίζει το 64% της δραστικότητας παρουσία 2mM Mg(II). Ομοίως, για την AtHESP-E114A, η δραστικότητα αγγίζει το 54% παρουσία 0.5mM Mn(II) σε σχέση με τη δραστικότητα της AtHESP-E114A παρουσία 2mM Mg(II).



Γράφημα 2. Η αξιοποίηση ιόντων Mn(II) από την AtHESP. Ως δείγμα δραστικότητας ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η αντίδραση ενζύμου υποστρώματος παρουσία 2mM Mg(II) που κρίθηκε ως η βέλτιστη. Στο γράφημα απεικονίζεται με μπλε, ενώ οι αντιδράσεις που έγιναν παρουσία Mn(II) φαίνονται με πορτοκαλί.

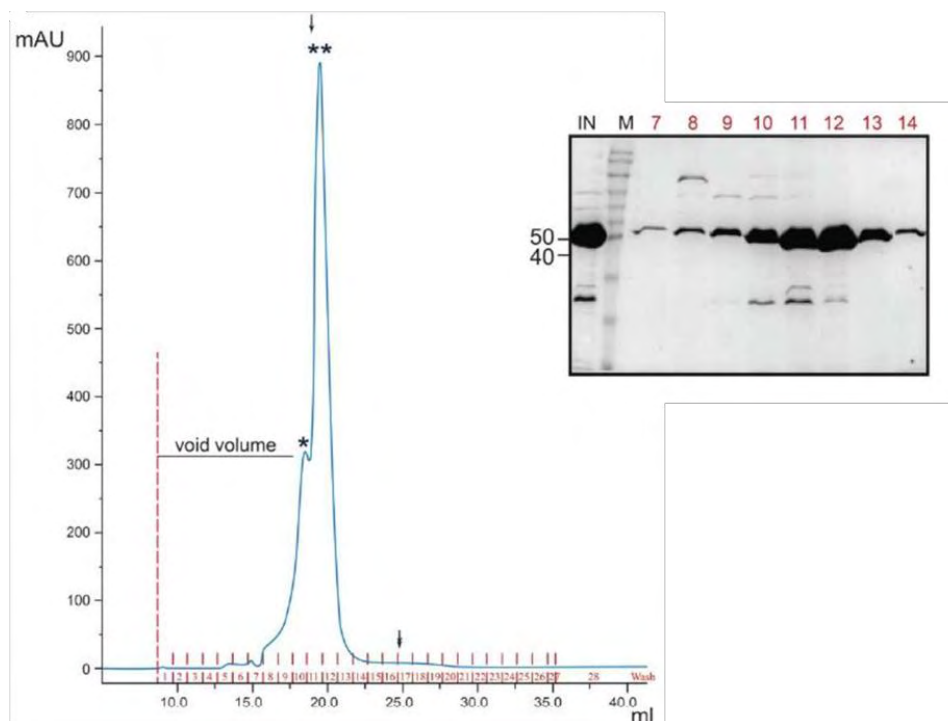


Γράφημα 3. Αξιοποίηση ιόντων Mn(II) από την AtHESP-E114A. Ως δείγμα δραστηκότητας ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η αντίδραση ενζύμου υποστρώματος παρουσία 2mM Mg(II) που κρίθηκε ως η βέλτιστη. Στο γράφημα απεικονίζεται με μπλε, ενώ οι αντιδράσεις της AtHESP-E114A, που έγιναν παρουσία Mn(II) φαίνονται με μωβ.

4.4 Η AtHESP είναι ένα ολιγομερές ένζυμο

4.4.1 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Τα αποτελέσματα των κινητικών μελετών, είναι ενδεικτικά αλλοστερικού ενζύμου. Κύριο χαρακτηριστικό των αλλοστερικών ενζύμων είναι η ύπαρξη πολλαπλών υπομονάδων και πολλαπλών καταλυτικών κέντρων. Η μοριακή μάζα της AtHESP, όπως υπολογίστηκε, είναι 47,1kDa. Με τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης στη στήλη Superose 12 10/300 GL, το μέγιστο της διακριτικής ικανότητας δεν ξεπερνά τα 150 kDa ενώ διαχωρίζει τις πρωτεΐνες του δείγματος ανά ~50 kDa αναλόγως τη μοριακή τους μάζα (βλ. 3.2.9.5). Στη στήλη φορτώθηκε δείγμα AtHESP συγκέντρωσης 16mg/mL. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 31, η AtHESP εκλύεται από τη στήλη ακριβώς μετά το πέρας του κενού όγκου στήλης, υποδηλώνοντας πως η μάζα του ολιγομερούς σε αυτές τις συνθήκες είναι τουλάχιστον 150kDa. Η επόμενη κορυφή φαίνεται στην υποδεικνυόμενη περιοχή των 50kDa. Οι κορυφές αντιστοιχούν σε μοριακή μάζα, πολλαπλάσια του μοριακού βάρους της AtHESP και αποτελούνται μόνο από την AtHESP, όπως διαπιστώθηκε από την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες [40].

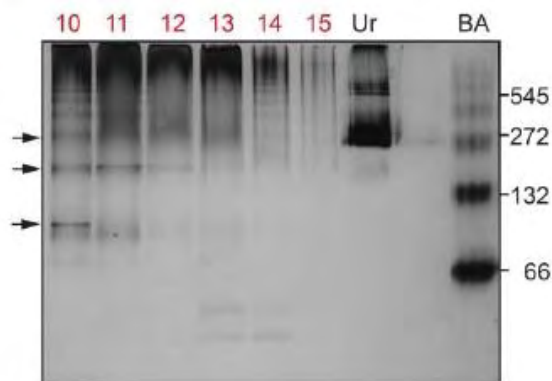


Εικόνα 31. Χρωματογράφημα στήλης μοριακής διήθησης. Κόκκινη διακεκομμένη: εισαγωγή δείγματος στη στήλη, μαύρη οριζόντιος: κενός όγκος στήλης, (*): 150 kDa, (**): 50 kDa. Τα βέλη υποδεικνύουν τις θέσεις των δεικτών μοριακής μάζας. Μονό βέλος, φωσφορυλάση του γλυκογόνου (μυες κονίκλου) 97 kDa, διπλό βέλος: λυσοζύμη 14.3 kDa. **Ένθετο: 10% SDS-PAGE των κλασμάτων της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης.** Οι αριθμοί των διαδρομών αντιστοιχούν στα κλάσματα της ÄKTA[40].

4.4.2 Ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες

4.4.2.1 Ηλεκτροφόρηση κλασμάτων χρωματογραφίας μοριακής διήθησης

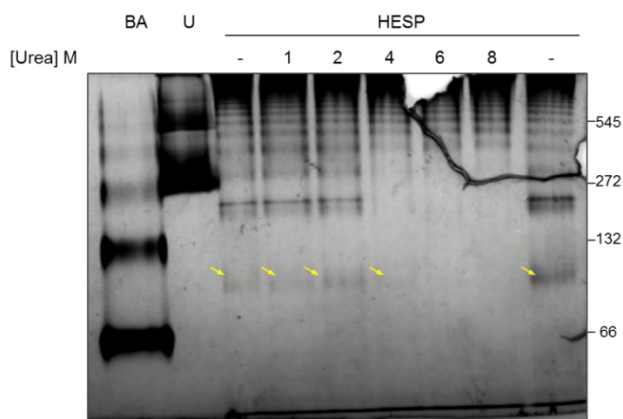
Τα κλάσματα που συλλέχθηκαν από τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης, εφόσον μετά από ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες επιβεβαίωσαν πως οι κορυφές στο φάσμα του υπεριώδους αντιστοιχούσαν στην κατά μεγάλο ποσοστό καθαρισμένη AtHESP, υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες ώστε να μελετηθεί το μέγεθος του ολιγομερούς της AtHESP. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 32, τα δείγματα που ηλεκτροφορήθηκαν φαίνεται να έχουν ολιγομερείς δομές, έως και τετραμερή, όπως διακρίνεται από τη διαχωριστική ικανότητα της πηκτής.



Εικόνα 32. Ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες 7% Native-PAGE των κλασμάτων της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης. Η ουρίαση (Ur) και η βόεια αλβουμίνη ορού (BA) χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες μοριακής μάζας και ολιγομερισμού. Τριμερές ουρίασης (272 kDa) και εξαμερές (545 kDa), και μονομερές BA (66 kDa) και διμερές (132 kDa). Τα βέλη στα αριστερά υποδεικνύουν ολιγομερείς δομές ήτοι διμερή, τριμερή και τετραμερή. Οι αριθμοί των διαδρομών αντιστοιχούν στα κλάσματα της ÄKTA [40].

4.4.2.2 Ηλεκτροφόρηση παρουσία ουρίας

Σταθερή συγκέντρωση AtHESP, επώαστηκε με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις ουρίας ώστε να διαπιστωθεί εάν για τις ολιγομερείς διαμορφώσεις που παρατηρούνται αποδίδονται σε υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις. Κάθε σωλήνας τύπου erpendorf είχε τελικό όγκο 120μL και η ποσότητα πρωτεΐνης παρέμεινε σταθερή, ενώ οι συγκεντρώσεις ουρίας που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στην Εικόνα 33. Παρατηρείται ένα κοινό πρότυπο μετανάστευσης της πρωτεΐνης στα δείγματα απουσία ουρίας με τα δείγματα που επώαστηκαν με έως και 2M ουρίας. Το πρότυπο ζωνών για τις διαδρομές παρουσία 4-8M ουρίας δεν είναι το ίδιο με αυτό απουσία ουρίας. Η πρωτεΐνη ξεκινά να αποδιατάσσεται παρουσία 4M ουρίας ενώ οι ολιγομερείς διαμορφώσεις είναι σταθερές για συγκέντρωση ουρίας έως 2M. Παρουσία συγκεντρώσεων ουρίας 6 και 8M η πρωτεΐνη φαίνεται να έχει αποδιαταχθεί πλήρως και να έχει σχηματίσει συσσωματώματα που δε διαχωρίζονται στην πηκτή.



Εικόνα 33. Ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες σε δείγματα πρωτεΐνης στα οποία έχει προστεθεί ουρία σε διάφορες συγκεντρώσεις. Η ουρίαση (Ur) και η βόεια αλβουμίνη ορού (BA) χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες μοριακής μάζας και ολιγομερισμού. Τριμερές ουριάσης (272 kDa) και εξαμερές (545 kDa), και μονομερές BA (66 kDa) και διμερές (132 kDa). Τα κίτρινα βέλη υποδεικνύουν χαμηλής μοριακής μάζας ζώνες που απουσιάζουν παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων ουρίας. Η πυκνότητα της πηκτής είναι 7% και έχει γίνει χρώση με Coomassie 0,1%.

5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το κερκάδιο σύστημα παρέχει στους οργανισμούς μια χρονική οργάνωση και τους επιτρέπει να προβλέπουν τις κυκλικές περιβαλλοντικές αλλαγές και να προσαρμόσουν τη φυσιολογία τους ανάλογα με αυτές [37]. Σε έναν ιστό όπως ο αμφιβλιστροειδής, όπου συμβαίνουν δραματικές αλλαγές μεταξύ ημέρας και νύχτας, η μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων για συγκεκριμένες στιγμές της ημέρας, είναι μια σημαντική διαδικασία. Ομοίως, γονίδια που εμπλέκονται στο κερκάδιο ρολόι εκφράζονται ρυθμικά στη διάρκεια του 24ώρου, πράγμα που υποδεικνύει πως το να ενεργοποιούνται και να απενεργοποιούνται τα γονίδια τη σωστή ώρα είναι μια διαδικασία μεγάλης σημασίας για τη διατήρηση της σωστής λειτουργίας του ρολογιού [35].

Το βιολογικό ρολόι ελέγχει κατά προσέγγιση το 10% του μεταγραφώματος (τρανσκριπτώματος) και οι ομάδες mRNA που είναι ρυθμικά ρυθμιζόμενες ποικίλουν μεταξύ των διαφόρων ιστών [39]. Στο φυτό *Arabidopsis thaliana* η αφθονία των μεταγράφων του 12% των γονιδίων έχει δείχθει πως βρίσκονται υπό τον έλεγχο του κερκαδίου ρυθμού, και θα μπορούσε να ισχύει, αν χρησιμοποιηθούν πιο ευαίσθητες μέθοδοι, ότι η πλειοψηφία των πυρηνικών γονιδίων αποκρίνονται στο κερκάδιο ρολόι στο επίπεδο αφθονίας του mRNA [80]. Κάθε πλεονέκτημα αρμοστικότητα που προκύπτει από τη λειτουργία του κερκαδίου ρολογιού έχει πολλές πιθανές βάσεις, καθώς το κερκάδιο ρολόι ρυθμίζει πολλές πτυχές της βιολογίας των φυτών, καθώς και του βασικού μεταβολισμού, της ορμονικής σηματοδότησης και των αποκρίσεων σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις [81].

Η Nocturnin εμπλέκεται σε διαδικασίες πέρα από τη βράχυνση της πολυ(A) ουράς. Στις λειτουργίες αυτές είναι και η συνοδεία της κίνησης παραγόντων στον πυρήνα μέσω αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών. Η Nocturnin δεν αποτελεί μόνο ένα ένζυμο κλειδί στον κερκάδιο 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 κερκάδιο γονίδιο, ένα γονίδιο δηλαδή, του οποίου η έκφραση καθοδηγείται από το κερκάδιο ρολόι, και αυτό το πρότυπο ρυθμικής έκφρασης τη διαφοροποιούν από τις άλλες απαδενυλάσεις [39].

Η απαδενυλίωση είναι η διαδικασία βράχυνσης της poly(A) ουράς από τα ευκαρυωτικά mRNA. Η απαδενυλίωση έχει δείχθει πως είναι το καθοριστικό βήμα για την αποσταθεροποίηση των mRNA και τη μεταφραστική σίγηση. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η απώλεια της poly(A) ουράς οδηγεί σε ταχεία αποικοδόμηση του mRNA από το 3' άκρο του, ενώ σε άλλες περιπτώσεις η απώλεια της ουράς αποτρέπει τη μετάφρασή του μέσω της παρεμπόδισης της δημιουργίας των κυκλικών πολυσωμάτων [33]. Υπάρχουν πολλές ενδείξεις που υποδεικνύουν πως η ρύθμιση σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, ρύθμιση μέσω απαδενυλίωσης, είναι σημαντική και απαραίτητη ώστε να υπάρχει ένα σωστά ρυθμισμένο κερκάδιο ρολόι [35].

Η AtHESP είναι μια ενδιαφέρουσα πρωτεΐνη προς μελέτη, καθώς διέπεται από κirkάδια ρύθμιση, παρουσιάζοντας μέγιστη έκφραση λίγο πριν τη σκοτεινή περίοδο, και ταυτόχρονα συνδυάζει την έκφρασή της με τη δράση της ως απαδενυλάση [40]. 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. Στην προσπάθεια να βελτιστοποιηθεί το πρωτόκολλο απομόνωσης και να εξασφαλιστεί η σταθερότητα της πρωτεΐνης έγινε υποκλωνοποίηση του cDNA της *AtHESP* σε ένα πλασμιδιακό φορέα που έφερε ετικέτα αγνώρισης την S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) η οποία κατόπιν του πρώτου καθαρισμού θα ήταν δυνατό να απομακρυνθεί μέσω της δράσης της πρωτεάσης 3C, την αλληλουχία που κωδικοποιεί για την περιοχή αναγνώρισης της τη φέρει ο πλασμιδιακός φορέας μεταξύ της ετικέτας αγχιστείας και του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης. Δεν προτιμήθηκε η απομόνωση της *AtHESP* με αυτό τον τρόπο, καθώς η υπερέκφραση και απομόνωση είχαν ως αποτέλεσμα τον εμπλουτισμό του δείγματος σε καθαρή GST και όχι ως τη χιμαιρική πρωτεΐνη GST-*AtHESP* (βλ. Εικόνα 28). Παράλληλα, για το σκοπό αυτό, της απομόνωσης της *AtHESP* σε ικανοποιητική ποσότητα και καθαρότητα, και την παραγωγή δείγματος πρωτεΐνης χωρίς ετικέτα αγχιστείας, δημιουργήθηκε ο φορέας pATHRA. Η απομόνωση της πρωτεΐνης με στήλη αγχιστείας νικελίου δεν έδειξε διαφορές σε σχέση με την απομόνωση της *AtHESP* από τον φορέα pET-15b (βλ. Εικόνα 16 και Εικόνα 19) και η τμήση της ετικέτας αλληλουχίας φαίνεται να έγινε επαρκώς (βλ. Εικόνα 20).

Η *AtHESP* είναι ένα ένζυμο με μια επικράτεια ενδονουκλεάσης- εξωνουκλεάσης- φωσφατάσης (EEP) με δράση απαδενυλάσης. Είναι ένα αλλοστερικό ένζυμο και εξαρτάται από μαγνήσιο [40]. Η μελέτη της κινητικής συμπεριφοράς της *AtHESP*, καθώς και η στοχευμένη μετάλλαξη του ενζύμου σε υποψήφια αμινοξέα του ενεργού του κέντρου, είχαν ως σκοπό την απόκτηση μιας πλήρους εικόνας της κινητικής του ενζύμου, τέτοιες μελέτες αποδίδουν πολλές πληροφορίες για τη συμπεριφορά αλλά και τη δομή του ενζύμου γενικότερα. Η σιγμοειδής καμπύλη της ταχύτητας προς συγκέντρωση υποστρώματος (βλ. Εικόνα 29, A) υποδηλώνει την ύπαρξη θετικής συνέργειας και έντονα θυμίζει τη συμπεριφορά αλλοστερικών ενζύμων με πολλαπλά κέντρα πρόσδεσης. Με την ανάλυση των κινητικών δεδομένων με σκοπό να υπολογιστεί ο αριθμός των κέντρων πρόσδεσης n . Τα αποτελέσματα (βλ. Εικόνα 29, B, Γ) της κινητικής ανάλυσης υποδηλώνουν πως η *AtHESP* είναι ένζυμο που εμφανίζει ισχυρή συνέργεια με τουλάχιστον 3 κέντρα πρόσδεσης υποστρώματος. Ένα αποτελεσματικό ένζυμο, αναγνωρίζει το υπόστρωμα, το τροποποιεί εύκολα και γρήγορα απελευθερώνει το προϊόν χωρίς να παράγει μεγάλο αριθμό μη αντιδρώντων ή πολύ σταθερών ενδιάμεσων ενώσεων. Τα ένζυμα το καταφέρνουν αυτό μειώνοντας την ενέργεια της μεταβατικής κατάστασης των χημικών και δομικής στερεοδιαμόρφωσης σταδίων εξισορροπώντας τη θεμελιώδη κατάσταση όλων των προσδεδμένων ε-

νώσεων ώστε μεγιστοποιηθεί η καταλυτική αποτελεσματικότητα [82]. Οι μεταλλάξεις των υποθετικών καταλυτικών αμινοξέων, έχει ως σκοπό τη διερεύνηση της σημασίας που μπορεί να έχει ένα κατάλοιπο σε συγκεκριμένες θέσεις και κατά πόσο επηρεάζει τη λειτουργία του ενζύμου. Καθώς οι απαδενυλάσες γενικά, και η AtHESP, ειδικά, είναι ένζυμα που απαιτούν δισθενή ιόντα Mg, είτε άλλων δισθενών μετάλλων, για αποτελεσματική κατάλυση [40]. Τα δισθενή ιόντα μετάλλων επιταχύνουν τις αντιδράσεις μειώνοντας την ενέργεια της μεταβατικής κατάστασης με διάφορους τρόπους, όπως την πόλωση του ηλεκτρονιόφιλου, την αναγωγή του φορτίου και τη σταθεροποίηση της αποχωρούσας ομάδας καθώς επίσης παρέχουν ισχυρή πρόσδεση ή σωστό προσανατολισμό του υποστρώματος [82].

Η στοχευμένη μεταλλαξιγένεση είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την ανίχνευση της σημασίας ορισμένων αμινοξέων για τη λειτουργία μιας πρωτεΐνης. Μεγάλες αλλαγές στο είδος ενός αμινοξέος μπορεί να αποκαλύψει κέντρα που είναι σημαντικά για τη διατήρηση της δομής της πρωτεΐνης. Κατά τη μελέτη κέντρων που έχουν λειτουργικό ενδιαφέρον, είναι σημαντικό να επιλεγούν αντικαταστάσεις αμινοξέων που δεν προβλέπεται να αλλάξουν δραματικά τη δομή, επιλέγοντας για παράδειγμα αμινοξέα με παρόμοιο μέγεθος με τα αρχικά [83]. Η λογική του πειράματος στην προκειμένη περίπτωση, έχει ως σκοπό την μετάλλαξη συντηρημένων καταλοίπων στα διάφορα είδη και διερεύνηση εάν όντως είναι σημαντικά για την κατάλυση και μετάλλαξη αυτών προς αλανίνη¹¹.

Τα κατάλοιπα γλουταμικού πολύ συχνά εμπλέκονται στα ενεργά κέντρα ή στα κέντρα πρόσδεσης ενζύμων. Το αρνητικό του φορτίο σημαίνει ότι μπορεί να αλληλεπιδράσει με θετικά φορτισμένα μη πρωτεϊνικά άτομα, όπως τα κατιόντα. Το γλουταμικό έχει κάπως μεγαλύτερη πλευρική αλυσίδα από το όμοιό του, το ασπαρτικό οξύ, πράγμα που σημαίνει πως είναι σχετικά εύκαμπτο ως μέρος της δομής της πρωτεΐνης και σχετίζεται πολύ συχνά με ενεργά κέντρα ή κέντρα πρόσδεσης ενζύμων. Σε συγκεκριμένες περιπτώσεις, μπορεί να έχει ρόλο παρόμοιο με αυτόν του ασπαρτικού στο καταλυτικό κέντρο μιας πρωτεΐνης [83].

Κατά τη διάρκεια των πειραματικών δοκιμασιών, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της κινητικής δοκιμασίας, καθώς οι περισσότερες κινητικές δοκιμασίες (assays) δεν είναι κατάλληλες για ποσοτική ανάλυση των αποτελεσμάτων, ενώ παράλληλα είναι χρονοβόρες. Η χρωματομετρική ποσοτική μέθοδος μέτρησης ενζυμικής δραστηριότητας με το κυανό του μεθυλενίου [75, 76] στερείται ευαισθησίας και απαιτεί υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος και ενζύμου. Οι κινητικές δοκιμασίες που βασίζονται στο διαχωρισμό σε πηκτές έχουν το μειονέκτημα της δύσκολης ποσοτικοποίησης. Τέλος, η ανάπτυξη κινητικών δοκιμασιών που σχετίζονται με τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης, απαιτούν

¹¹ Η αλανίνη είναι πιθανώς το πιο αδιάφορο αμινοξύ. Δεν είναι ιδιαίτερος υδρόφοβο και είναι μη πολικό. Διαθέτει έναν κανονικό C_β άνθρακα, πράγμα που σημαίνει πως γενικά παρεμποδίζεται στερεοχημικά στον ίδιο βαθμό με άλλα αμινοξέα όσον αφορά τις διαμορφώσεις που μπορεί να αποκτήσει ο βασικός κορμός. Η πλευρική αλυσίδα της αλανίνης είναι άκρως μη δραστική και ως εκ τούτου, σπανίως είναι άμεσα εμπλεκόμενη στη λειτουργία πρωτεϊνών [83].

μεγάλους όγκους αντιδράσεων [77]. Οι κινητικές μελέτες φθορισμού που πραγματοποιήθηκαν για την AtHESP και την AtHESP-E114A (βλ. Εικόνα 30), οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η μετάλλαξη που δημιουργήθηκε στο κατάλοιπο γλουταμικού στη θέση 114 της AtHESP, μειώνει σε μεγάλο βαθμό την καταλυτική αποτελεσματικότητα του ενζύμου, επιβεβαιώνοντας την υπόθεση, βάσει ομολογίας της AtHESP με άλλες καλύτερα μελετημένες απαδενυλάσες άλλων οργανισμών της ίδιας οικογένειας (βλ. Εικόνα 8), πως το γλουταμικό 114 της AtHESP είναι ένα σημαντικό αμινοξύ για τη δραστικότητα του ενζύμου. Η αντικατάσταση της πλευρικής αλυσίδας του καταλοίπου του ασπαρτικού οξέος με ένα μεθύλιο, δηλαδή μετάλλαξη προς αλανίνη, πιθανώς είχε ως πρακτικό αποτέλεσμα την απομάκρυνση ενός οξυγόνου αρκετά σημαντικού για την αλληλεπίδραση με το απαραίτητο για την κατάλυση ιόν Mg.

Σημειώνεται σε αυτό το σημείο, πως η προσθήκη ιόντων Mn στην αντίδραση, έδειξε, πως η δραστικότητα της AtHESP, είναι κατά 40% μειωμένη σε σχέση με τη δραστικότητα που σημειώνεται παρουσία Mg(II). Κάτι ανάλογο, σημειώνεται κατά τη μελέτη της δραστικότητας της AtHESP-E114A παρουσία Mn(II), σε σχέση με τη δραστικότητα του ενζύμου απουσία μεταλλάξεων και παρουσία Mg(II). Συμπεραίνεται, λοιπόν, πως η δραστικότητα του μεταλλαγμένου ενζύμου δεν ανακτάται παρουσία ιόντων Mn(II) και πως η μετάλλαξη του καταλοίπου του γλουταμικού στη θέση 114 απαλείφει την ύπαρξη ατόμων κρίσιμων, όπως το οξυγόνο, για την αλληλεπίδραση με ιόντα μετάλλων, τα οποία είναι απαραίτητα για την αποτελεσματική κατάλυση.

Είναι γνωστό, πως τα αλλοστερικά ένζυμα διαθέτουν τουλάχιστον 2 κέντρα πρόσδεσης του υποστρώματος και σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης της κινητικής η AtHESP διαθέτει τουλάχιστον 3 κέντρα πρόσδεσης. Για τη διερεύνηση αυτής της υπόθεσης, πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία μοριακής διήθησης και ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες. Η υπόθεση του ολιγομερισμού της AtHESP επαληθεύτηκε, καθώς οι κορυφές του χρωματογραφήματος καταδεικνύουν ότι υπάρχει ένα ολιγομερές σύμπλοκο μοριακού βάρους ~150kDa, το οποίο εκλύεται άμεσα μετά την περιοχή του κενού όγκου στήλης. Η ανάλυση των κλασμάτων που προέκυψαν από τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης με ανάλυση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες επαλήθευσε την εικόνα της χρωματογραφίας, δηλαδή την ύπαρξη ενός ολιγομερούς συμπλόκου μοριακής μάζας ~150kDa.

Η χημική αποδιάταξη, με έναν παράγοντα όπως η ουρία, είναι ένας από τους κύριους τρόπους για να αξιολογηθεί η σταθερότητα της πρωτεΐνης, η επίδραση μιας πρωτεΐνης στη σταθερότητα ή η αποδιάταξη της πρωτεΐνης. Παρότι η ουρία βρίσκει ευρεία χρήση, η μοριακή βάση της ιδιότητας της ουρίας να αποδιατάσει πρωτεΐνες είναι άγνωστη. Η ουρία φαίνεται να οδηγεί στην αποδιάταξη με έμμεσο και άμεσο μηχανισμό ταυτόχρονα. Η άμεση εμπλοκή της στη διαδικασία της αποδιάταξης προσδεδεμένη στην πρωτεΐνη αντιδρώντας με τις αμινομάδες των αμινοξέων διαταράσσοντας τις φυσικές αλληλεπιδράσεις οδηγώντας έτσι στην αποδιάταξη. Η έμμεση συμμετοχή της στην αποδιάταξη της πρωτεΐνης συμβαίνει με την αλλαγή του περιβάλλοντος του διαλύτη από την ουρία. Η ουρία

μειώνει την ύπαρξη και ισχύ των υδροφοβικών φαινομένων και οδηγεί στην έκθεση των υδροφοβικών μερών της πρωτεΐνης [84].

Καθώς υπάρχει περίπτωση η δημιουργία ολιγομερών συμπλόκων να είναι εφήμερη, λόγω σχηματισμού ασθενών υδροφοβών αλληλεπιδράσεων, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες αφού πρώτα έγινε επώαση των δειγμάτων πρωτεΐνης με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ουρίας. Η ουρία είναι ένας ουδέτερος παράγοντας μετουσίωσης ο οποίος διασπά τις υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις αλλά όχι τις ηλεκτροστατικές. Έτσι εάν η δημιουργία ολιγομερών διαμορφώσεων της AtHESP οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις υδροφοβικού τύπου, τότε η προσθήκη ουρίας θα οδηγούσε στη διάσπαση των ολιγομερών που οφείλονται στις υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις και αυτό θα ήταν ορατό με μια ζώνη στο πρότυπο μετανάστευσης των πρωτεϊνών αντί για περισσότερες [69]. Δεν παρατηρείται αλλαγή στο πρότυπο ζωνών των μεταναστευόμενων πρωτεϊνών κατά την αύξηση της συγκέντρωσης της ουρίας σε συγκεντρώσεις έως 2M (βλ. Εικόνα 33), γεγονός που δηλώνει πως ο σχηματισμός των ολιγομερών δομών της AtHESP, οι οποίες γίνονται εμφανείς από τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης (βλ. Εικόνα 31) αλλά και την ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (βλ. Εικόνα 32), δεν οφείλονται σε υδροφοβές αλληλεπιδράσεις, αλλά σε άλλου τύπου ασθενείς αλληλεπιδράσεις. Σε συγκεντρώσεις ουρίας 4-8M, η τεταρτοταγής διαμόρφωση της πρωτεΐνης διαταράσσεται, γεγονός αναμενόμενο. Η απουσία ζωνών στις διαδρομές αυτές είναι αναμενόμενη καθώς σε υψηλές συγκεντρώσεις ουρίας η πρωτεΐνη αποδιατάσσεται πλήρως και είτε το φορτίο που αποκτά η πολυπεπτιδική αλυσίδα δεν επιτρέπει την είσοδο στην πηκτή, είτε λόγω της αποδιάταξης σχηματίζονται συσσωματώματα που δεν διαχωρίζονται στην πηκτή. Εάν η δημιουργία των ολιγομερών οφείλταν σε υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, λόγω υψηλής συγκέντρωσης NaCl για παράδειγμα, το πρότυπο των πολλαπλών ζωνών έπρεπε να έχει αποδιαταχθεί από την παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων ουρίας. Τα παραπάνω αποτελέσματα συνάδουν άριστα με την ανάλυση της κινητικής, όπου προκύπτει από τους υπολογισμούς, πως η AtHESP έχει τουλάχιστον 3 κέντρα πρόσδεσης.

Η ποικιλομορφία των απαδενυλασών, η πολυπλοκότητα των αλληλεπιδρώντων μορίων, καθώς και η ρύθμισή τους, δημιουργεί ένα περίπλοκο δίκτυο ώστε να ρυθμίζεται ακριβώς η ενδοκυττάρια ομοιόσταση του RNA. Η ταυτοποίηση αλληλεπιδρώντων μορίων της AtHESP αναμένεται να συνεισφέρει τα μέγιστα στην κατανόηση της αλλοστερικής συμπεριφοράς που εμφανίζει, ενώ η ταυτοποίηση των διακριτών επιτόπων αναμένεται να παρέχει τη δομική βάση των ρυθμιστικών απαιτήσεων της. Η αλλοστερική συμπεριφορά της AtHESP, μπορεί να γίνει κατανοητή εάν ληφθεί υπόψη ο καίριος ρόλος της poly(A) ουράς στη σταθερότητα του mRNA. Οι απαδενυλάσες είναι ένζυμα που υποβάλλονται σε εκτεταμένη ρύθμιση και η δραστηότητά τους επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως ο υποκυτταρικός εντοπισμός, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, τα cis-δραστικά στοιχεία των mRNA στόχων καθώς και trans δραστικοί ρυθμιστικοί παράγοντες.

Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως η AtHESP είναι ολιγομερής, και η αλλοστερική συμπεριφορά που επιδεικνύει μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα ρυθμιστικό μηχανισμό. Για να ολοκληρωθεί ο βιοχημικός χαρακτηρισμός της AtHESP απαιτείται μελέτη της κινητικής συμπεριφοράς του ενζύμου, αλλά και η κατά θέση μετάλλαξη του ενζύμου σε επιπλέον υποψήφια αμινοξέα του ενεργού του κέντρου. Επίσης, ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα παρουσίαζε η διερεύνηση ενζυμικών δοκιμασιών με υπόστρωμα ευκαρυωτικό πλήρους μήκους mRNA. Τέλος, θα ήταν επιθυμητή η ανάπτυξη κρυστάλλων της AtHESP, με απώτερο σκοπό τη επίλυση της δομής της μέσω περίθλασης ακτίνων Χ.

6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Alberts B, Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. *Molecular Biology of the Cell* 5th ed. USA: Garland Science; 2008.
- [2] Liu X, Green CB. Circadian regulation of nocturnin transcription by phosphorylated CREB in *Xenopus* retinal photoreceptor cells. *Molecular and cellular biology* 2002;22:7501-11.
- [3] Robles MS, Cox J, Mann M. In-vivo quantitative proteomics reveals a key contribution of post-transcriptional mechanisms to the circadian regulation of liver metabolism. *PLoS genetics* 2014;10:e1004047.
- [4] Χαραλαμπίδης Κ. *Αναπτυξιακή & Μοριακή Βιολογία φυτών: Έμβρυο*; 2009.
- [5] Harmer SL, Panda S, Kay SA. Molecular bases of circadian rhythms. *Annual review of cell and developmental biology* 2001;17:215-53.
- [6] Woodruff ER, Chun LE, Hinds LR, Spencer RL. Diurnal Corticosterone Presence and Phase Modulate Clock Gene Expression in the Male Rat Prefrontal Cortex. *Endocrinology* 2016;en20151884.
- [7] Lim C, Allada R. Emerging roles for post-transcriptional regulation in circadian clocks. *Nature neuroscience* 2013;16:1544-50.
- [8] Mohawk JA, Takahashi JS. Cell autonomy and synchrony of suprachiasmatic nucleus circadian oscillators. *Trends in neurosciences* 2011;34:349-58.
- [9] Birky TL, Bray MS. Understanding circadian gene function: animal models of tissue-specific circadian disruption. *IUBMB life* 2014;66:34-41.
- [10] Nelson DL, Cox, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*, Chapter 26: RNA metabolism. New York, USA: Worth Publishers; 2000.
- [11] Su AA, Randau L. A-to-I and C-to-U editing within transfer RNAs. *Biochemistry Biokhimiia* 2011;76:932-7.
- [12] Harnisch C, Moritz, B., Rammelt, C., Temme, C., Wahle, E. *Activity and Function of Deadenylases*: Elsevier; 2012.
- [13] Lewin B. *Genes VIII*: Pearson; 2004.
- [14] Μπαλατσός ΝΑΑ. Δράση τροποποιητών βιολογικής απόκρισης και αντικαρκινικών φαρμάκων στην δομή και τη λειτουργία ενζύμων σταθερότητας μηνύματος RNA, ο ρόλος τους στη βιολογία του καρκίνου και η σημασία στη διάγνωση και τη θεραπεία. Αθήνα: Πανεπιστήμιο Αθηνών; 1999.
- [15] Μπαλατσός ΝΑΑ. Αντίδραση πολυαδενυλίωσης TBB; 2014.
- [16] Goldstrohm AC, Wickens M. Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nature reviews Molecular cell biology* 2008;9:337-44.
- [17] Paschoud S, Dogar AM, Kuntz C, Grisoni-Neupert B, Richman L, Kuhn LC. Destabilization of interleukin-6 mRNA requires a putative RNA stem-loop structure, an AU-rich element, and the RNA-binding protein AUF1. *Molecular and cellular biology* 2006;26:8228-41.
- [18] Pulcrano G, Leonardo R, Piscopo M, Nargi E, Locascio A, Aniello F, et al. PLAUF binding to the 3'UTR of the H3.3 histone transcript affects mRNA stability. *Gene* 2007;406:124-33.
- [19] Zhao J. CJ, Lu B., Dong L., Wang H., Bi C., Wu G., Guo H., Wu M., Guo Y. TIP30 induces apoptosis under oxidative stress through stabilization of p53 messenger RNA in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008;11 4133-41.
- [20] Ross J. mRNA stability in mammalian cells. *Microbiological reviews* 1995;59:423-50.

- [21] Hammett A, Pike BL, Heierhorst J. 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. *The Journal of biological chemistry* 2002;277:22469-74.
- [22] Kadyrova LY, Habara Y, Lee TH, Wharton RP. Translational control of maternal Cyclin B mRNA by Nanos in the *Drosophila* germline. *Development* 2007;134:1519-27.
- [23] Hook BA, Goldstrohm AC, Seay DJ, Wickens M. Two yeast PUF proteins negatively regulate a single mRNA. *The Journal of biological chemistry* 2007;282:15430-8.
- [24] Jurado AR, Tan D, Jiao X, Kiledjian M, Tong L. Structure and function of pre-mRNA 5'-end capping quality control and 3'-end processing. *Biochemistry* 2014;53:1882-98.
- [25] Garneau NL, Wilusz J, Wilusz CJ. The highways and byways of mRNA decay. *Nature reviews Molecular cell biology* 2007;8:113-26.
- [26] Meyer S, Temme C, Wahle E. Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 2004;39:197-216.
- [27] Parker R, Song H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nature structural & molecular biology* 2004;11:121-7.
- [28] Schoenberg DR, Maquat LE. Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nature reviews Genetics* 2012;13:246-59.
- [29] Wu X, Brewer G. The regulation of mRNA stability in mammalian cells: 2.0. *Gene* 2012;500:10-21.
- [30] Zuo Y, Deutscher MP. Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic acids research* 2001;29:1017-26.
- [31] Gancedo JM. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 1998;62:334-61.
- [32] Liang P. A decade of differential display. *BioTechniques* 2002;33:338-44, 46.
- [33] Douris N, Green CB. NOC out the fat: a short review of the circadian deadenylase Nocturnin. *Annals of medicine* 2008;40:622-6.
- [34] Green CB, Besharse JC. Identification of a novel vertebrate circadian clock-regulated gene encoding the protein nocturnin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93:14884-8.
- [35] Baggs J. GC. Functional Analysis of Nocturnin. *Methods in Molecular Biology* 2003;317:243-54.
- [36] Baggs JE, Green, C. B. Nocturnin, a deadenylase in *Xenopus laevis* retina: a mechanism for posttranscriptional control of circadian-related mRNA. *Current biology* : CB 2003;13:189-98.
- [37] Garbarino-Pico E, Niu S, Rollag MD, Strayer CA, Besharse JC, Green CB. Immediate early response of the circadian poly(A) ribonuclease nocturnin to two extracellular stimuli. *Rna* 2007;13:745-55.
- [38] Kojima S, Gendreau KL, Sher-Chen EL, Gao P, Green CB. Changes in poly(A) tail length dynamics from the loss of the circadian deadenylase Nocturnin. *Scientific reports* 2015;5:17059.
- [39] Godwin AR, Kojima S, Green CB, Wilusz J. Kiss your tail goodbye: the role of PARN, Nocturnin, and Angel deadenylases in mRNA biology. *Biochimica et biophysica acta* 2013;1829:571-9.
- [40] Delis C, Krokida A, Tomatsidou A, Tsikou D, Beta RA, Tsioumpekou M, et al. AtHESPERIN: A Novel Regulator of Circadian Rhythms with Poly(A)-degrading Activity in Plants. *RNA biology* 2015:0.

- [41] Patsi-Garin E. Επίτομο λεξικό Ελληνικής Μυθολογίας: Χάρης Πάτσης; 1969.
- [42] Phillips TA, VanBogelen RA, Neidhardt FC. Ion gene product of *Escherichia coli* is a heat-shock protein. *Journal of bacteriology* 1984;159:283-7.
- [43] Novagen. Competent cells.
- [44] Harper S, Speicher DW. Expression and purification of GST fusion proteins. *Current protocols in protein science / editorial board, John E Coligan [et al]* 2008;Chapter 6:Unit 6
- [45] Arnau J, Lauritzen C, Petersen GE, Pedersen J. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein expression and purification* 2006;48:1-13.
- [46] Leong LE. The use of recombinant fusion proteases in the affinity purification of recombinant proteins. *Molecular biotechnology* 1999;12:269-74.
- [47] Waugh DS. Making the most of affinity tags. *Trends in biotechnology* 2005;23:316-20.
- [48] Waugh DS. An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. *Protein expression and purification* 2011;80:283-93.
- [49] Shapiro AL, Vinuela E, Maizel JV, Jr. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical and biophysical research communications* 1967;28:815-20.
- [50] Weber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of biological chemistry* 1969;244:4406-12.
- [51] Switzer RC, 3rd, Merrill CR, Shifrin S. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry* 1979;98:231-7.
- [52] Chevallet M, Luche S, Rabilloud T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature protocols* 2006;1:1852-8.
- [53] Chomczynski P. Solubilization in formamide protects RNA from degradation. *Nucleic acids research* 1992;20:3791-2.
- [54] Brody JR, Kern SE. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. *Analytical biochemistry* 2004;333:1-13.
- [55] Wolf B, Lesnaw JA, Reichmann ME. A mechanism of the irreversible inactivation of bovine pancreatic ribonuclease by diethylpyrocarbonate. A general reaction of diethylpyrocarbonate . A general reaction of diethylpyrocarbonate with proteins. *European journal of biochemistry / FEBS* 1970;13:519-25.
- [56] Malathi Raman KM. One solution for cloning and mutagenesis: In-Fusion® HD Cloning Plus. *Nature methods* 2014.
- [57] TaKaRa C-. In-Fusion® HD Cloning Kit User Manual. 2014.
- [58] Healthcare G. GST Gene fusion system Handbook. 2009.
- [59] Aich P, Patra M, Chatterjee AK, Roy SS, Basu T. Calcium chloride made *E. coli* competent for uptake of extraneous DNA through overproduction of OmpC protein. *The protein journal* 2012;31:366-73.
- [60] Hatami N, Naderkhani, G., Shah, N. and Young, B. . The Effects of Pretreatment of Competent Cells with Nalidixic Acid on Efficiency of Chemically-induced Transformation in *Escherichia coli* B23. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)* 2004.
- [61] Bukau B BJ, Boos W. Ca²⁺-induced permeabilization of the *Escherichia coli* outer membrane: comparison of transformation and reconstitution of binding-protein-dependent transport. *Journal of bacteriology* 1985;163.

- [62] Egger LA, Park H, Inouye M. Signal transduction via the histidyl-aspartyl phosphorelay. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 1997;2:167-84.
- [63] Carter P. Site-directed mutagenesis. *The Biochemical journal* 1986;237:1-7.
- [64] Genetics N. Midori Green advanced DNA stain.
- [65] Rio DC, Ares M, Jr., Hannon GJ, Nilsen TW. Polyacrylamide gel electrophoresis of RNA. *Cold Spring Harbor protocols* 2010;2010:pdb prot5444.
- [66] Petrov A, Tsa A, Puglisi JD. Analysis of RNA by analytical polyacrylamide gel electrophoresis. *Methods in enzymology* 2013;530:301-13.
- [67] John M, Clark, J.R., Switzer, R.L. Ηλεκτροφόρηση. Πειραματική Βιοχημεία: Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης; 1991. p. 45.
- [68] Bio-Rad. A guide to polyacrylamide gel electrophoresis and detection Bio-Rad.
- [69] He GJ, Yan YB. Self-association of poly(A)-specific ribonuclease (PARN) triggered by the R3H domain. *Biochimica et biophysica acta* 2014;1844:2077-85.
- [70] Healthcare G. Affinity Chromatography, Methods & Principles: GE Healthcare; 2009.
- [71] Bornhorst JA, Falke JJ. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods in enzymology* 2000;326:245-54.
- [72] Porath J. Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein expression and purification* 1992;3:263-81.
- [73] Gel Filtration Principles and methods Sweden: GE Healthcare Life Sciences; 2010.
- [74] Gel filtration columns and media, Selection Guide. Sweden: GE Healthcare Life Sciences; 2012.
- [75] Greiner-Stoeffele T, Grunow M, Hahn U. A general ribonuclease assay using methylene blue. *Analytical biochemistry* 1996;240:24-8.
- [76] Cheng Y, Liu WF, Yan YB, Zhou HM. A nonradioactive assay for poly(a)-specific ribonuclease activity by methylene blue colorimetry. *Protein and peptide letters* 2006;13:125-8.
- [77] Maryati M, Kaur I, Jadhav GP, Olotu-Umoren L, Oveh B, Hashmi L, et al. A fluorescence-based assay suitable for quantitative analysis of deadenylase enzyme activity. *Nucleic acids research* 2014;42:e30.
- [78] Segel IH. Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems. : Wiley Interscience; Wiley; 1975.
- [79] Leatherbarrow RJ. GraFit Version 6. In: Ltd. ES, editor. Horley, U.K.2009.
- [80] Ral JP, Colleoni C, Wattedled F, Dauvillee D, Nempont C, Deschamps P, et al. Circadian clock regulation of starch metabolism establishes GBSSI as a major contributor to amylopectin synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant physiology* 2006;142:305-17.
- [81] Robertson McClung C. Wheels within wheels: new transcriptional feedback loops in the *Arabidopsis* circadian clock. *f1000 prime reports* 2014;6.
- [82] Adams JA, Taylor SS. Divalent metal ions influence catalysis and active-site accessibility in the cAMP-dependent protein kinase. *Protein science : a publication of the Protein Society* 1993;2:2177-86.
- [83] Betts M, Russel, R. Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions: John Wiley and sons, Ltd.; 2003.
- [84] Bennion BJ, Daggett V. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100:5142-7.

7 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΙΝΑΚΑΣ XVI. INFUSION ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ cDNA ΤΗΣ AtHESP ΣΤΟ ΦΟΡΕΑ pGEX-6P-1. ΜΕ ΚΟΚΚΙΝΟ ΕΠΙΣΗΜΑΙΝΕΤΑΙ ΤΟ ΤΜΗΜΑ ΤΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΠΟΥ ΕΙΝΑΙ ΕΙΔΙΚΟ ΓΙΑ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ-ΣΤΟΧΟ

		Tm (°C)	% GC
Έμπροσθεν εκκινήτης (FW)	GGGATCCCCGGAATT ATGTTTAGTTCTACA ACTCTG	104	44.4
Όπισθεν εκκινήτης (REV)	GTCGACCCGGGAATT CGAAACTTCCTATTCCCGA	104	52.9

ΠΙΝΑΚΑΣ XVII. ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΦΟΡΕΑ pATHRA ΜΕ ΤΗ ΘΕΣΗ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΑΣΗΣ 3C

			Tm (°C)	% GC
pET-15b	FW	CCGATCCTCGACATCTGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCGCTGCTGTGATGATG	53.8	60
	REV	CATCATCACACAGCGGGCCCCTGAACAGAACTTCCAGATGCTCGATCCGG		
pET-15b-HESP	FW	GATGATGCAGATGTGAACTAAACATGGGCCCTGAACAGAACTTCCAGGCTGCTG TGATGATGATGATGATGGCTG	64.2	48.7
	REV	CAGCCATCATCATCATCACACAGCCTGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCATGTTT AGTTCTACAACCTCTGCATCATC		

ΠΙΝΑΚΑΣ XVIII. ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΗΝ AtHESP

			Tm (°C)	% GC
E114A	FW	GATTTCTTTTGTCTGCAGGCGGTAGATGAGTACGATAGC	71.6	46.2
	REV	GCTATCGTACTCATCTACCGCCTGCAGACAAAAGAAATC		