

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

*Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας*

**«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ- ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»**

Μαριάννα Ριζούλη

*Ετερόλογη έκφραση, απομόνωση, χαρακτηρισμός και δοκιμασίες
προσδιορισμού της δομής της απαδενυλάσης AtHESPERIN*

Μεταπτυχιακή Διατριβή

2021

ΤΙΤΛΟΣ: *Ετερόλογη έκφραση, απομόνωση, χαρακτηρισμός και δοκιμασίες προσδιορισμού της δομής της απαδενυλάσης AtHESPERIN*

TITLE: *Heterologous expression, purification, characterization and structural studies of the deadenylase AtHESPERIN*

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

- ❖ Νικόλαος Μπαλατσός (επιβλέπων καθηγητής), Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- ❖ Δημήτριος Λεωνίδας, Καθηγητής Βιοχημείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- ❖ Βασιλική Σκαμνάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μεταβολισμού,
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--|----|
| ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ..... | 4 |
| Περίληψη | 6 |
| Abstract | 7 |
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 8 |
| 1.1 Ο ημερονύκτιος (κικράδιος) ρυθμός | 8 |
| 1.1.1 Μοριακή οργάνωση του κικράδιου ρολογιού..... | 9 |
| 1.1.2 Το κικράδιο ρολόι στα φυτά..... | 9 |
| 1.2 Συμμεταγραφικές τροποποιήσεις | 10 |
| 1.2.1 Απαδενυλίωση..... | 13 |
| 1.2.2 Απαδενυλάσες | 14 |
| 1.2.3 Απαδενυλάσες DEDD | 15 |
| 1.2.4 Απαδενυλάσες EEP..... | 15 |
| 1.2.5 Ρύθμιση της απαδενυλίωσης του mRNA | 16 |
| 1.2.6 Η HESPERIN στο φυτό <i>Arabidopsis thaliana</i> | 18 |
| 2 Υλικά-Μέθοδοι | 20 |
| 2.1 Υλικά..... | 20 |
| 2.1.1 Βακτηριακά στελέχη..... | 20 |
| 2.1.2 Πλασμιδιακοί φορείς | 20 |
| 2.1.3 Διαλύματα | 20 |
| 2.1.4 Ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες SDS-PAGE | 22 |
| 2.1.5 Χρώση με Coomassie..... | 23 |
| 2.1.6 Μελέτη ενζυμικής δραστηριότητας | 24 |
| 2.2 Οργανολογία | 25 |
| 2.3 Μεθοδολογία | 26 |
| 2.3.1 Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων BL21-Gold με πλασμιδιακό φορέα pATHRA 26 | |
| 2.3.2 Παραγωγή της ανασυνδυασμένης AtHESPERIN | 27 |
| 2.3.3 Λύση βακτηριακών κυττάρων..... | 27 |
| 2.3.4 Απομόνωση της AtHESPERIN με χρωματογραφία αγχιστείας ακινητοποιημένων μετάλλων (IMAC) | 28 |

| | | |
|-------|--|----|
| 2.3.5 | Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford | 29 |
| 2.3.6 | Συμπύκνωση και διαπίδυση της AtHESPERIN | 29 |
| 2.3.7 | Ανοσοαποτύπωμα πρωτεϊνών κατά Western | 30 |
| 2.3.8 | Κρυσταλλογραφία ακτινών Χ..... | 31 |
| 3 | Αποτελέσματα-Συζήτηση | 35 |
| 3.1 | Βέλτιστες συνθήκες απομόνωσης της AtHESPERIN..... | 35 |
| 3.2 | Εξέταση συνθηκών κρυστάλλωσης | 41 |
| | Βιβλιογραφία..... | 44 |

Περίληψη

Το κirkάδιο ρολόι είναι ένας 24ωρος μηχανισμός που βασίζεται στην ρυθμική έκφραση γονιδίων. Η επεξεργασία της πολυ(A) ουράς των μορίων mRNA, και συγκεκριμένα η βράχυνσή της, είναι ένας από τους κύριους τρόπους με τους οποίους καθορίζεται η διάρκεια ζωής του mRNA. Η διαδικασία της βράχυνσης της πολυ(A) ουράς καταλύεται από ένζυμα που ονομάζονται απαδενυλάσες. Η HESPERIN είναι μια απαδενυλάση από το φυτό *Arabidopsis thaliana* η οποία ρυθμίζεται από τον κirkάδιο ρυθμό, ενώ είναι η μόνη κirkάδια απαδενυλάση που έχει χαρακτηριστεί έως σήμερα. Στην παρούσα εργασία γίνεται βελτιστοποίηση των συνθηκών απομόνωσης του ανασυνδυασμένου ενζύμου από βακτήρια και εξετάστηκαν συνθήκες κρυστάλλωσης της AtHESPERIN. Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκε ο τροποποιημένος φορέας pATHRA. Οι βελτιωμένες συνθήκες απομόνωσης του ενζύμου επέτρεψαν την δοκιμασία συνθηκών κρυστάλλωσης και οδήγησαν στο σχηματισμό κρυστάλλων σφαιρουλιτικής μορφής οι οποίοι χρειάζονται επιπλέον βελτιστοποίηση ώστε να πραγματοποιηθούν πειράματα περίθλασης ακτίνων-X για την επίλυση της δομής της AtHESPERIN.

Λέξεις κλειδιά: απαδενυλίωση, ουρά πολυ(A), αποικοδόμηση mRNA, κirkάδιοι ρυθμοί, AtHESPERIN

Abstract

The circadian clock is a 24-hour mechanism that is based on the rhythmic expression of specific genes. The processing of the polyA tail of mRNAs, specifically the shortening of the tail, is one of the main ways of determining the lifespan of mRNA. The shortening of the polyA tail is catalyzed by enzymes known as deadenylases. HESPERIN is a deadenylase from *Arabidopsis thaliana*, and it is the only circadian deadenylase identified to date. Herein, we describe improvements on the purification process of recombinant AtHESPERIN from bacteria using a modified expression vector (pATHRA). The modifications on the purification process described here, led to sufficient amount of produced protein to allow for crystallization screens to be performed in an attempt to elucidate AtHESPERIN's structure using X-ray crystallography. The crystallization screens resulted in the production of spherulites which need optimization.

Keywords: Deadenylation, poly(A) tail, mRNA decay, Circadian rhythms, AtHESPERIN

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ο ημερονύκτιος (κirkάδιος) ρυθμός

Ο όρος κirkάδιος επινοήθηκε από τον Franz Halberg τη δεκαετία του 1950 και προέρχεται από την λατινική φράση «circa diem» που σημαίνει «κατά τη διάρκεια μίας ημέρας». Ο κirkάδιος ρυθμός είναι οι σωματικές, νοητικές και συμπεριφορικές αλλαγές που ακολουθούν έναν ημερήσιο κύκλο ημέρας νύχτας. Βρίσκεται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς από τα κυανοβακτήρια μέχρι τον άνθρωπο. Η μελέτη του κirkάδιου ρυθμού ονομάζεται χρονοβιολογία (chronobiology) (Avello et al., 2019). Οι περισσότερες λειτουργίες των ζωντανών οργανισμών ελέγχονται από βιολογικούς ρυθμούς. Οι κirkάδιοι ρυθμοί είναι ένα υποσύνολο των βιολογικών ρυθμών με συγκεκριμένη χρονική περίοδο 24 ωρών. Κύριος ρυθμιστής αυτού του συστήματος είναι και ο κύκλος φώς-σκότους. Οι εσωτερικοί ταλαντωτές που ρυθμίζουν αυτούς τους ημερήσιους ρυθμούς ονομάζονται κirkάδια ρολόγια (Robles et al., 2014), τα οποία καθοδηγούν ρυθμικά την έκφραση γονιδίων συγχρονίζοντας έτσι τον μεταβολισμό με την φυσιολογία. Ο ρυθμικός έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης είναι σημαντικό χαρακτηριστικό του ελέγχου των ρυθμικών διαδικασιών που υπόκεινται στον έλεγχο του κirkάδιου ρολογιού (Beta and Balatsos, 2018).

Σε όλους σχεδόν τους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, ο μηχανισμός του κirkάδιου ρολογιού είναι μεμονωμένα κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά, για παράδειγμα στη *Drosophila melanogaster*, εάν απομονωθούν έχουν την ικανότητα να ρυθμιστούν σε νέους κύκλους φωτός και σκοταδιού. Δεν είναι πλήρως κατανοητές όλες οι μέθοδοι λειτουργίας του κirkάδιου ρολογιού. Ωστόσο, ένα βασικό χαρακτηριστικό του είναι η συσσώρευση και αποικοδόμηση δύο πρωτεϊνών που συμβάλουν στην ρύθμιση γονιδίων. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι η Tim (timeless) και η Per (period) και η μετάφραση των mRNA τους γίνεται στο κυτταρόπλασμα και σχηματίζουν ένα ετεροδιμερές με την σταδιακή συσσώρευσή τους. Μετά από μια χρονική περίοδο το ετεροδιμερές διασπάται και οι πρωτεΐνες Tim και Per μετακινούνται στον πυρήνα όπου η Per καταστέλλει την έκφραση των γονιδίων *Per* και *Tim* δημιουργώντας ένα σύστημα μεταγραφικής να τροφοδότησης. Η επαναφορά του ρολογιού επιτυγχάνεται ως απόκριση σε νέο κύκλο φωτός σκότους. Με τον ίδιο τρόπο, συμβαίνει η ρύθμιση του βασικού μοριακού μηχανισμού

του κερκάδιου ρυθμού και στα θηλαστικά (Saez et al., 2007).

1.1.1 Μοριακή οργάνωση του κερκάδιου ρολογιού

Στα θηλαστικά, ο κύριος ταλαντωτής βρίσκεται στον υπερχασματικό πυρήνα (suprachiasmatic nucleus, SCN) ενώ υπάρχουν και περιφερικά κερκάδια ρολόγια σε διάφορους ιστούς. Στην *Drosophila* ο κύριος ταλαντωτής αποτελείται από τουλάχιστον 150 εγκεφαλικούς νευρώνες. Η μοριακή οργάνωση του κερκάδιου ρολογιού αποτελείται από τρεις βασικές αρχές τα μονοπάτια εισαγωγής, το ρολόι ή κεντρικός ταλαντωτής και τα μονοπάτια εξόδου σηματοδότησης. Τα μονοπάτια εισαγωγής ενσωματώνουν εξωτερικά ή περιβαλλοντικά σήματα (χρονοδότες, ευρέως γνωστοί και ως zeitgebers) με την λειτουργία του ρολογιού το οποίο τελικά παράγει προϊόντα τα οποία ελέγχουν τις διάφορες βιολογικές διεργασίες. Οι μοριακοί μηχανισμοί του κερκάδιου ρολογιού αποδεικνύουν τη σπουδαιότητα της καθημερινής ρυθμικής έκφρασης γονιδίων. Οι μοριακοί μηχανισμοί φαίνεται να βασίζονται σε αυτορρυθμιζόμενα, αλληλοσυνδεμένα μονοπάτια ανατροφοδότησης (TTFL-transcription/translation feedback loops) βασικών γονιδίων. Βασικά χαρακτηριστικά του κερκάδιου ρολογιού που οφείλονται στη ρυθμική έκφραση αυτών των βασικών γονιδίων, είναι, η διατήρηση του ρυθμού, απόκριση σε εξωγενή ή περιβαλλοντικά ερεθίσματα και ρύθμιση των μεταβολών θερμοκρασίας. Τα μονοπάτια εξόδου καθορίζονται από τις μεταφραστικές ρυθμίσεις των γονιδίων ελέγχου του κερκάδιου ρολογιού. Οι μεταφραστικές αυτές ρυθμίσεις πραγματοποιούνται από κερκάδιους μεταγραφικούς παράγοντες και συν-ρρυθμιστές (Robles et al., 2014).

1.1.2 Το κερκάδιο ρολόι στα φυτά

Στα φυτά το κερκάδιο ρολόι ελέγχει και την φωτοπεριοδική χρονομέτρηση, δηλαδή συμβάλει στην αναγνώριση των εποχιακών αλλαγών και την ρύθμιση των αποκρίσεων σε αυτές τις αλλαγές όπως είναι η άνθηση, η αναπαραγωγή κ.α..

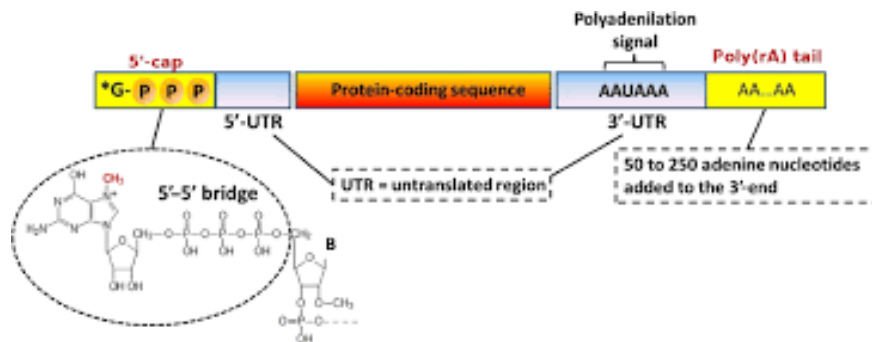
Τα φυτά έχουν την ικανότητα να αντιδρούν σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα χωρίς τη δυνατότητα μετακίνησης. Αυτό επιτυγχάνεται μεταξύ άλλων και ακολουθώντας την ενεργειακή πηγή τους, δηλαδή το φως με μια απόκριση που ονομάζεται φωτοτροπισμός. Ο φωτοτροπισμός επιτρέπει στα φυτά να στρέφουν τους βλαστούς και τα φωτοσυνθετικά τους μέρη προς την ενεργειακή τους πηγή. Πειραματικές πηγές επιβεβαιώνουν πως τα φυτά αντιλαμβάνονται φωτοπεριοδικές αλλαγές μέσω των ώριμων φύλλων καθώς και ότι η άνθηση επάγεται στα φύλλα όταν

αυτά εκτεθούν σε ευνοϊκό φωτοπεριοδικό κύκλο. Στα φυτά, η άνθηση καθορίζεται κυρίως από ένα εσωτερικό ρολόι το οποίο διατηρεί σταθερούς ρυθμούς σε φυσιολογικές αναπτυξιακές συνθήκες. Το ρολόι αυτό μηδενίζεται κάθε φορά που υπόκειται σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα όπως η διάρκεια του φωτός ή η θερμοκρασία συγχρονίζοντας έτσι τους εποχιακούς κύκλους. Αυτό επιτυγχάνεται καθώς τα φυτά αντιλαμβάνονται και την διάρκεια του σκότους καταφέροντας έτσι να συγχρονιστούν με τις εποχιακές μεταβολές και να ρυθμίσουν κατάλληλα την διαδικασία της άνθησης. Στην *Arabidopsis thaliana* έχουν αναγνωριστεί τρία γονίδια τα οποία ρυθμίζουν τον κύριο ταλαντωτή μέσω ενός μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης. Τα γονίδια αυτά είναι τα *LHY*, *CCA1* και *TOC1* (McClung, 2006).

1.2 Συμμεταγραφικές τροποποιήσεις

Με τη μεταγραφή, τα μόρια RNA τα οποία προκύπτουν μπορεί να χρήζουν κάποιας περαιτέρω επεξεργασίας όπως τα περισσότερα mRNA και μόρια tRNA. Τα μόρια αυτά, είτε δεν υφίστανται καμία τροποποίηση είτε κάποια μικρή τροποποίηση μετά ή κατά την διάρκεια της μεταγραφής. Το πρωτογενές μετάγραφο ενός ευκαρυωτικού mRNA συνήθως περιέχει όλες τις περιοχές που περιέχονται στο γονίδιο από το οποίο προήλθε, δηλαδή τόσο τις περιοχές που κωδικοποιούν για το τελικό πολυπεπτίδιο (εξόνια) όσο και τις ενδιάμεσες περιοχές που δεν κωδικοποιούνται στις πολυπεπτιδική αλυσίδα (ιντρόνια). Με το πέρας της επεξεργασίας του πρωτογενούς μεταγράφου το τελικό μόριο mRNA μπορεί να έχει μόλις το ένα δέκατο του μεγέθους του πρόδρομου mRNA.

Οι συμμεταγραφικές τροποποιήσεις σε μόρια mRNA περιλαμβάνουν τη διαδικασία του ματίσματος, την προσθήκη καλύπτρας στο άκρο 5' του mRNA και την προσθήκη μιας ουράς πολυ(A) των 80-250 αδενυλικών καταλοίπων στο άκρο 3' του mRNA. Οι τροποποιήσεις των άκρων 5' και 3' του mRNA διατηρούνται κατά την ωρίμανση του πρωτογενούς mRNA στο τελικό ώριμο mRNA (Harnisch et al., 2012).



Εικόνα 1 mRNA με 5' καλύπτρα, 3' ουρά πολυ(A) και μετά τη διαδικασία ματίσματος (Roviello et al., 2015)

Τα περισσότερα μόρια πρώιμου mRNA υφίστανται τη διαδικασία του ματίσματος. Το μάτισμα είναι η διαδικασία κατά την οποία τα ιντρόνια που περιέχονται στο πρωτογενές μετάγραφο αφαιρούνται και τα εξόνια συνδέονται για τον σχηματισμό του τελικού μεταγράφου. Η διαδικασία του ματίσματος είναι μια ιδιαίτερα ευαίσθητη διαδικασία η οποία είναι αυστηρά ελεγχόμενη από το κύτταρο καθώς μία μόνο ολίσθηση μπορεί να μετατοπίσει ολόκληρο το πλαίσιο ανάγνωσης του μεταγράφου καταλήγοντας έτσι σε τελείως διαφορετικό πρωτεϊνικό προϊόν.

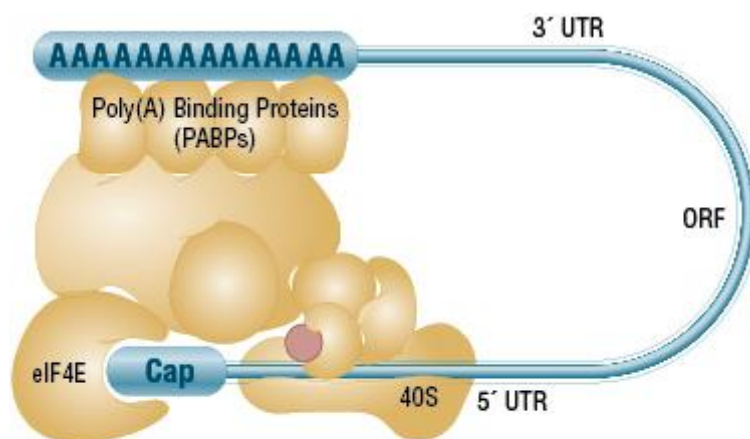
Στο 3' άκρο του πρόδρομου mRNA μια αλληλουχία AAUAAA αναγνωρίζεται από την ενδονουκλεάση CPSF63, μια υπομονάδα του παράγοντα CPSF, και το διασπά. Μετά την διάσπαση από την ενδονουκλεάση η πολυ(A) πολυμεράση (μια ATP:πολυνουκλεοτιδική αδενυλυμεταφοράση) προσθέτει περί τα 250 αδενυλικά κατάλοιπα τα οποία προέρχονται από δότες αδενυλικών ATP [3' ουρά πολυ(A)]. Ο ρόλος της 3' ουράς πολυ(A) φαίνεται να είναι προστατευτικός καθώς φαίνεται να ενισχύει την σταθερότητα του mRNA αλλά και την αποτελεσματικότητα της μετάφρασης (Nelson, 2017).

1.2.1 Πολυαδενυλίωση - προσθήκη ουράς πολυ(A)

Το ένζυμο που καταλύει την σύνθεση της πολυ(A) ουράς στο 3' άκρο του mRNA, δηλαδή, η πολυ(A) πολυμεράση, περιεγράφηκε για πρώτη φορά από τους Edmonds και Abrams το 1960 (Edmonds and Abrams, 1960). Η σύνδεση της πολυ(A) ουράς με τους κικαδίους ρυθμούς έγινε περισσότερο από μια δεκαετία αργότερα, ενώ η σύνδεση της πολυ(A) πολυμεράσης σε θηλαστικά έγινε περί τις αρχές της δεκαετίας του 1990. Η πολυαδενυλίωση είναι μία σημαντική για την ωρίμανση του mRNA τροποποίηση που συμβαίνει τόσο συμματαγραφικά στον πυρήνα, όσο και μετα-μεταγραφικά στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου. Στο

κυτταρόπλασμα η ουρά πολυ(A) επεξεργάζεται περαιτέρω καθορίζοντας έτσι την σταθερότητα του μορίου mRNA. Η επεξεργασία της πολυ(A) ουράς στο κυτταρόπλασμα πραγματοποιείται μέσω των κυτταροπλασματικών στοιχείων πολυαδενυλίωσης (Cytoplasmic polyadenylation elements, CPE), στα οποία προσδένονται κυτταροπλασματικές πολυ(A) συνδεόμενες πρωτεΐνες (cytoplasmic polyadenylation element binding protein, CPEB) (Beta and Balatsos, 2018). Η πρόσδεση των CPEB σε CPEs οδηγεί σε προσέλκυση της κυτταροπλασματικής πολυ(A) πολυμεράσης GLD2 καθώς και άλλων πρωτεϊνών οι οποίες συμμετέχουν στην επιμήκυνση της ουράς πολυ(A) ή στην εκκίνηση της μετάφρασης του mRNA (Kojima et al., 2012).

Στην αδενυλική αλληλουχία του 3' άκρου του πυρηνικού RNA, αλλά και του κυτταροπλασματικού mRNA, βρίσκονται συνδεδεμένες πρωτεΐνες γνωστές ως PABPs [Poly(A) Binding Proteins]. Συνεπώς, το πολυαδενυλιωμένο 3' άκρο του mRNA είναι προσδεμένο με πολλαπλές μονομερείς πρωτεΐνες PABP οι οποίες έχουν βρεθεί σε διάφορες συγγενικές μορφές σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Οι κυτταροπλασματικές PABP συνδέονται επίσης και στο παράγοντα εκκίνησης της μετάφρασης eIF4G με σκοπό τον σχηματισμό μίας «κλειστής θηλιάς» συμβάλλοντας στην προώθηση της εκκίνησης της μετάφρασης (Tarun and Sachs, 1996).



Εικόνα 2 Αντίδραση της πολυαδενυλίωσης, PABP: πρωτεΐνη σύνδεσης στην πολυ(A) ουρά, eIF4E, eukaryotic Translation initiation Factor, παράγοντας πρόσδεσης εκκίνησης της μετάφρασης (Ryan et al., 2004).

Μελέτες έχουν δείξει πως οι ρυθμικές μεταβολές της πολυ(A) ουράς βρίσκονται υπό τον έλεγχο του κερκάδιου ρολογιού τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα. Επίσης υποδηλώνουν πως το μήκος της πολυ(A) ουράς φαίνεται να καθορίζει την αποτελεσματικότητα της μετάφρασης (Kojima et al., 2012). Πρόσφατε μελέτες σε *Caenorhabditis elegans* φαίνεται να δείχνουν πως μόρια mRNA τα οποία έχουν μακρύτερες πολυ(A) ουρές, παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης ενώ η μείωση του μήκους της πολυ(A) ουράς φαίνεται να σχετίζεται με την ικανότητα διατήρησης της σταθερότητας του μορίου mRNA κατά την μετάφραση ενώ ταυτόχρονα ενισχύει την απόδοση της μετάφρασης (Lima et al., 2017). Μεταβολές στην διαδικασία της πολυαδενυλίωσης καθώς και στις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην επεξεργασία του άκρου 3' μορίων mRNA επιτρέπουν στα κύτταρα να μεταβάλλουν τα επίπεδα συγκέντρωσης των πρωτεϊνών σε μεταγραφικό επίπεδο με ταχείς ρυθμούς χωρίς να είναι απαραίτητη η πρωτεϊνική σύνθεση, επεξεργασία ή αποικοδόμηση (Kojima et al., 2012). Τέλος μεταβολές στο μήκος της πολυ(A) ουράς κατά τη διάρκεια της ημέρας φαίνεται να σχετίζεται έντονα με την ρυθμική παραγωγή πρωτεϊνών, χωρίς απαραίτητα να σχετίζεται με τα σταθερά επίπεδα έκφρασης των mRNA.

1.2.1 Απαδενυλίωση

Το τελικό στάδιο για κάθε μόριο RNA είναι η αποικοδόμηση. Ο ρυθμός παραγωγής / αποικοδόμησης των μορίων RNA διαδραματίζει σημαντικό ρόλο ώστε να διατηρηθούν τα επίπεδα των μορίων σταθερά στο κύτταρο. Όταν το προϊόν ενός γονιδίου σταματά να είναι απαραίτητο στο κύτταρο η αποικοδόμηση των RNA μορίων συμβάλλουν στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης.

Η απαδενυλίωση είναι η διαδικασία βράχυνσης της 3' ουράς πολυ(A) των mRNA. Η απαδενυλίωση είναι μια διαδικασία που λαμβάνει χώρα συνήθως σε δύο στάδια. Αρχικά, η μεγάλη σε μήκος πολυ(A) ουρά (~250nt) βραχύνεται από το πρωτεϊνικό σύμπλοκο PAN2-PAN3 σε περίπου 100nt. Στη συνέχεια ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο, για παράδειγμα το CCR4-CAF1 στα θηλαστικά, βραχύνει ακόμη περισσότερο την πολυ(A) ουρά σε περίπου 8-12 nt. Η απαδενυλίωση θεωρείται ένας σημαντικό παράγοντας που ρυθμίζει-καθορίζει τη διάρκεια ζωής των μορίων mRNA (Delis et al., 2016).

Η απαδενυλίωση – αφαίρεση της πολυ(A) ουράς αποσταθεροποιεί το mRNA. Η αποσταθεροποίηση του mRNA μπορεί να οδηγήσει σε αναστολή της έναρξης της

μετάφρασης αλλά και σε αποικοδόμηση του mRNA (Dehlin et al., 2000). Η διαδικασία της αποικοδόμησης του mRNA κατέχει σημαντικό ρόλο στην έκφραση των γονιδίων του κερκάδιου ρολογιού και των *output*. Όπως προαναφέρθηκε, η λειτουργία της πολυ(A) ουράς στο 3' άκρο του mRNA καθορίζει ή συμβάλλει στην σταθερότητα του μορίου mRNA καθώς και στη σωστή λειτουργικότητα τόσο της μεταγραφής όσο και της μετάφρασης. Συνεπώς, η αποικοδόμηση του mRNA καθορίζεται αρχικά από το χρόνο ζωής αλλά και τη σταθερότητα του μορίου mRNA.

Η ρύθμιση της σταθερότητας του mRNA είναι πρωταρχικής σημασίας για την ρυθμική έκφραση του mRNA. Ο ρυθμός της ρυθμικής αποικοδόμησης του mRNA σχετίζεται άμεσα με το μήκος της ουράς πολυ(A). Αυτό το γεγονός υποστηρίζει πως τα μετα-μεταγραφικά ρυθμιστικά μονοπάτια πρέπει να λάβουν χώρα ώστε ο κύκλος της έκφρασης-αποικοδόμησης των μορίων mRNA να διατηρείται σε σταθερά επίπεδα. Παράδειγμα αποτελεί στο ήπαρ ποντικών, όπου μετά την απομάκρυνση των δομών του κερκάδιου ρολογιού, ορισμένα βασικά γονίδια διατήρησαν τη ρυθμική τους έκφραση, ανάμεσα σε αυτά και γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον μετα-μεταγραφικό έλεγχο, όπως είναι η Nocturnin και η CIRP (Morf et al., 2012).

Κυτταροπλασματικά, αλλαγές στο μήκος της ουράς πολυ(A), και συγκεκριμένα η βράχυνση της ουράς, μπορεί να οδηγήσει σε καταστολή της μετάφρασης αλλά και σε αποικοδόμηση του mRNA.

1.2.2 Απαδενυλάσες

Οι απαδενυλάσες είναι εξωριβονουκλεάσες οι οποίες υδρολύουν το RNA και συγκεκριμένα την πολυ(A) ουρά των μορίων mRNA, με κατεύθυνση 3'→5' η οποία οδηγεί σε απελευθέρωση 5'-AMP. Η δράση τους εξαρτάται από την παρουσία ιόντων Mg. Παρόλο που η ουρά πολυ(A) είναι το βασικό υπόστρωμα των απαδενυλασών, ορισμένες μπορούν να αποικοδομήσουν άλλα ριβοπολυμερή μόρια *in vitro*. Μετά την απομάκρυνση ή τη βράχυνση της πολυ(A) ουράς από τις απαδενυλάσες άλλα ένζυμα ενεργοποιούν την περεταιίρω επεξεργασία των μορίων mRNA ή την αποικοδόμηση τους.

Οι έως τώρα γνωστές απαδενυλάσες έχουν διαχωριστεί σε δύο υπεριοικογένειες. Ο διαχωρισμός αυτός πραγματοποιήθηκε με βάση τη σύγκριση των επικρατειών νουκλεάσης. Οι δύο αυτές κατηγορίες είναι οι εξωνουκλεάση-ενδονουκλεάση-φωσφατάση (exonuclease-endonuclease-phosphatase ή EEP) και οι

DEDD (Goldstrohm and Wickens, 2008). Οι απαδενυλάσες που εντάσσονται σε κάθε οικογένεια φαίνονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Ποικιλομορφία απαδενυλασών

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

Οι απαδενυλάσες από κάθε είδος κατηγοριοποιήθηκαν είτε προς την οικογένεια DEDD (Asp-Glu-Asp-Asp) είτε προς την οικογένεια εξονουκλεασών-ενδονουκλεασών-φωσφατασών βάσει των αμινοξικών αλληλουχιών των επικρατειών εξωνουκλεάσης τους. Τα είδη όπου έχει αποδειχθεί ενζυμική δραστικότητα επισημαίνονται με +, με + επισημαίνονται τα είδη όπου προβλέπεται να υπάρχει ενζ. δραστικότητα και με - επισημαίνονται τα είδη στα οποία δεν έχει καθοριστεί η ενζυμική δραστικότητα. Sc: *S.cerevisiae*, Ce: *C. elegans*, Dm: *D.melanogaster*, Xl: *X.laevis*, Mm: *M. musculus*, Hs: *H.sapiens*(Goldstrohm and Wickens, 2008).

1.2.3 Απαδενυλάσες DEDD

Οι απαδενυλάσες τύπου DEDD, είναι νουκλεάσες οι οποίες έχουν συντηρημένα καταλυτικά κατάλοιπα Asp και Glu, τα οποία είναι διάσπαρτα σε τρία μοτίβα εξωνουκλεάσης τα οποία συντονίζουν ιόντα Mg⁺. Οι ριβονουκλεάσες που καταλύουν την επεξεργασία της πολυ(Α) ουράς, όπως η PARN ανήκουν στις απαδενυλάσες τύπου DEDD, όπως επίσης και οι απαδενυλάσες των ευρύτερων οικογενειών CAF1, CAF1Z, POP2 και PAN2. Κάθε οικογένεια έχει διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες καλύπτοντας ένα μεγάλο φάσμα βιολογικών λειτουργιών του κυττάρου, από την καταστροφή του DNA (POP2), το στρες (PAN2) και τον κυτταρικό κύκλο (POP2), έως την σπερματογένεση (POP2) και ωρίμανση των ωοκυττάρων (PARN) (Goldstrohm and Wickens, 2008).

1.2.4 Απαδενυλάσες EEP

Οι απαδενυλάσες EEP είναι ένζυμα τα οποία διαθέτουν συντηρημένα καταλυτικά κατάλοιπα Asp και His στους επιτόπους νουκλεάσης. Στις νουκλεάσες EEP συμπεριλαμβάνονται οι οικογένειες ένζυμων CCR4 και οι 2' φωσφοδιεστεράση

(2' PDE). Αντιστοίχως με τις νουκλεάσες τύπου DEDD, οι νουκλεάσες τύπου EEP καταλύουν/συμμετέχουν σε βιολογικές διεργασίες ενός ευρέος φάσματος. Οι νουκλεάσες CCR4 συμμετέχουν στην ωογένεση, στην καταστροφή του DNA, τον κυτταρικό κύκλο κ.α. Τέλος, η 2' PDE συμμετέχει στην απόκριση της ιντερφερόνης, ενώ σημαντικό είναι να σημειωθεί πως η απαδενυλάση αυτή αποικοδομεί τόσο 3'→5' όσο και 2'→5' δηλαδή αποικοδομεί την πολυ(A) ουρά όταν το 5' φωσφορικό της κάθε αδενοσίνης είναι συνδεδεμένο είτε με το 2' είτε με το 3' υδροξύλιο (Cooke et al., 2010).

1.2.4.1 Σύμπλοκα απαδενυλασών

Φαίνεται πως οι απαδενυλάσες μπορούν να λειτουργήσουν μόνες τους, δηλαδή ειδικές απαδενυλάσες να στοχεύουν ένα μόνο τύπο mRNA διασφαλίζοντας έτσι τον πλήρη έλεγχο της διεργασίας με τη χρήση ενός μόνο ενζύμου. Ωστόσο, φαίνεται πως οι απαδενυλάσες μπορούν να υπερκαλύπτουν λειτουργικά η μία την άλλη όταν πολλές διαφορετικές απαδενυλάσες στοχεύουν σε ένα mRNA.

Οι απαδενυλάσες επίσης μπορεί να λειτουργούν μέσα σε ένα σύμπλοκο πολλαπλών υπομονάδων. Υπομονάδες αυτού του συμπλόκου μπορούν να συμβάλλουν στην ενεργότητα και καταλυτική δραστικότητα της απαδενυλάσης. Επιπλέον πολλές απαδενυλάσες σχηματίζουν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή. Για παράδειγμα η νουκλεάση PARN είναι λειτουργική μόνο σε σχηματισμό ομοδιμερούς, ενώ οι CCR4 και POP2 ενεργοποιούνται όταν σχηματίζουν ετεροδιμερή.

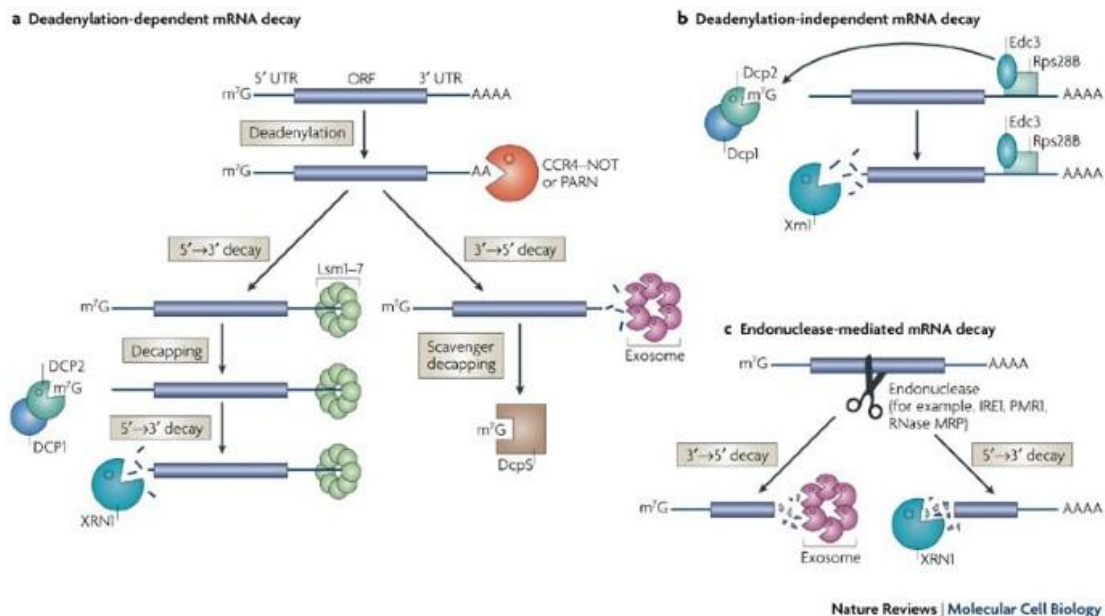
Όπως θα ήταν αναμενόμενο, διαφορετικά ετεροδιμερή καλύπτουν διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες του κυττάρου καθώς διαθέτουν διαφορετική εξειδίκευση. Για παράδειγμα, κάποια ετεροδιμερή όπως τα CCR4 με POP2 σε πολλά είδη συνδέονται με πρωτεΐνες NOT σχηματίζοντας περίπλοκα σύμπλοκα με πολλαπλές υπομονάδες. Οι πρωτεΐνες NOT συμμετέχουν στην απαδενυλίωση του mRNA, επηρεάζουν την ενεργότητα των ετεροδιμερών POP2/CCR4 ενώ μπορούν να λειτουργήσουν ως προσαρμογείς (Goldstrohm and Wickens, 2008).

1.2.5 Ρύθμιση της απαδενυλίωσης του mRNA

Τα ενεργά μόρια mRNA, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα οποία είναι έτοιμα προς μετάφραση, προστατεύονται από την απαδενυλίωση της πολυ(A) ουράς τους, ενώ τα μόρια mRNA τα οποία είναι ασταθή, απαδενυλιώνονται άμεσα και οδηγούνται προς αποικοδόμηση. Η απαδενυλίωση αποτελεί έναν από τους τρόπους

με τους οποίους τα mRNA μόρια οδηγούνται σε αποικοδόμηση όπως φαίνεται στην Εικόνα 3 υπογραμμίζοντας πως η απαδενυλίωση είναι μια διαδικασία υψηλά ελεγχόμενη.

Η ρύθμιση της απαδενυλίωσης επιτυγχάνεται με τη ρύθμιση της μεταγραφής και της μετάφρασης των απαδενυλασών και των ρυθμιστικών μορίων των απαδενυλασών. Ένας τρόπος ρύθμισης της απαδενυλίωσης είναι η αναστολή της ενζυμικής ενεργότητας των απαδενυλασών.



Εικόνα 3 Τρόποι απαδενυλίωσης (Goldstrohm and Wickens, 2008)

Η ρύθμιση της απαδενυλίωσης επίσης υπόκειται σε χωροταξικό έλεγχο, καθώς μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε κυτταροπλασματικά είτε πυρηνικά. Η τοποθέτηση της κάθε απαδενυλάσης στον πυρήνα ή στο κυτταρόπλασμα, τελικά μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση διαφορετικών ρυθμιστικών μορίων και επεξεργασία διαφορετικών μορίων mRNA.

Επιπλέον, συγκεκριμένα χαρακτηριστικά των mRNA στόχων, συμβάλλουν στη ρύθμιση της απαδενυλίωσης, όπως για παράδειγμα η 5' καλύπτρα του mRNA. Η 5' καλύπτρα των μορίων mRNA, αλληλεπιδρά άμεσα με την νουκλεάση PARN, συμβάλλοντας έτσι στην ενεργοποίηση της ενεργότητάς της. Στοιχεία της αλληλουχίας των mRNA που συχνά βρίσκονται στην 3'-UTR περιοχή του mRNA, έχουν επίσης την δυνατότητα να αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες που προσδένονται

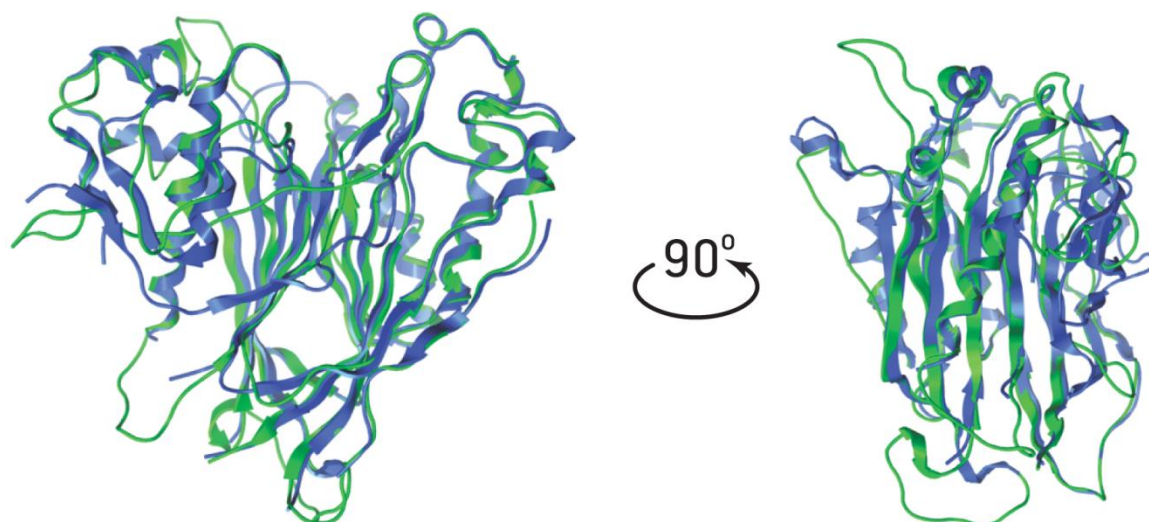
στο RNA όπως είναι οι PABP, οι οποίες στρατολογούν απαδενυλάσες ενισχύοντας έτσι τη δράση τους (Dehlin et al., 2000).

Ένας ακόμη τρόπος ρύθμισης της απαδενυλίωσης των mRNA είναι η ρύθμιση της αποσύνδεσης των PABP πρωτεϊνών από την πολυ(A) ουρά. Οι PABP πρωτεΐνες βρίσκονται προσδεμένες, όπως αναφέρθηκε στην πολυ(A) ουρά, μην επιτρέποντας έτσι στις απαδενυλάσες πρόσβαση στο υπόστρωμα που πρέπει να δράσουν. Ρυθμίζοντας, λοιπόν την αποσύνδεσή τους από το σημείο αυτό, παρέχεται πρόσβαση στις απαδενυλάσες να ενεργήσουν στο υπόστρωμα (Funakoshi et al., 2007).

1.2.6 Η HESPERIN στο φυτό *Arabidopsis thaliana*

Η HESPERIN είναι μια 3'-5' εξωριβονουκλεάση της οποίας η δράση εξαρτάται από ιόντα Mg(II). Η HESPERIN δηλαδή είναι ένας συμμεταγραφικός ρυθμιστής του κirkάδιου ρυθμού με δράση αποαδενυλάσης. Με βάση τη βιβλιογραφία, έχουν βρεθεί τουλάχιστον 26 διαφορετικές αποαδενυλάσες στο φυτό *A.thaliana*. Η AtHESPERIN έχει, όπως προαναφέρθηκε, δράση αποαδενυλάσης, δηλαδή να βραχαίνει ή να αφαιρεί την πολυ(A) ουρά μορίων mRNA. Η υπερέκφραση της AtHESPERIN στο φυτό μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων του κirkάδιου ρολογιού TOC και CCA, χωρίς ωστόσο να χαθεί ή να μεταβληθεί η ρυθμική κατατομή έκφρασης των γονιδίων αυτών αλλά και σε αναστρέψιμη αλλά σημαντική καθυστέρηση της απάντησης στο οξειδωτικό στρες και πιθανόν να έχει καθοριστικό ρόλο στην αύξηση και ανάπτυξη των φυτών. Επιπλέον, θα μπορούσε να έχει σημαντική συμμετοχή στην απόκριση σε αβιοτικές και βιοτικές καταπονήσεις, γεγονός που την καθιστά άξια περαιτέρω έρευνας (Delis et al., 2016).

Η AtHESPERIN είναι η πρώτη κirkάδια αποαδενυλάση στα φυτά με μέγιστα επίπεδα έκφρασης της το απόγευμα, ενώ δεν έχει ταυτοποιηθεί καμία άλλη αποαδενυλάση να σχετίζεται με το κirkάδιο ρολόι σε άλλους οργανισμούς (Beta et al., 2020, Delis et al., 2016). Η AtHESPERIN ανήκει στην υπεροικογένεια EEP νουκλεασών με υψηλή ομολογία ως προς το ενεργό κέντρο με άλλα, καλύτερα μελετημένα, μέλη της οικογένειας αυτής όπως η CNOT6L (βλ. Εικόνα 4) (Beta et al., 2020). Επιπλέον, έχει δειχθεί πως είναι ένα αλλοστερικό ένζυμο με ικανότητα σχηματισμού ομοτριμερών για τη δραστηριότητά της (Delis et al., 2016).



Εικόνα 4. Μοντέλο ομολογίας της AtHESPERIN. Το μοντέλο (AtHESPERIN) εμφανίζεται με μπλε χρώμα ενώ με πράσινο απεικονίζεται η δομή οδηγός (CNOT6L) (Beta et al., 2020).

2 Υλικά-Μέθοδοι

2.1 Υλικά

2.1.1 Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για υπερέκφραση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης είναι τα BL21- Gold (DE3). Η σειρά κυττάρων BL21- Gold (DE3) είναι ειδική για έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών γιατί απουσιάζουν οι πρωτεάσες *Lon* και *OmpT* που θα μπορούσαν να μειώσουν τα επίπεδα της παραγόμενης πρωτεΐνης. Επίσης περιέχουν επιπλέον κωδικόνια που σπάνια χρησιμοποιούνται από την *E.coli* επιτρέποντας έτσι την έκφραση πρωτεϊνών σε μεγάλες ποσότητες (Phillips et al., 1984)

2.1.2 Πλασμιδιακοί φορείς

Πλασμίδιο είναι ένα δίκλωνο, κυκλικό τμήματα DNA σε διάφορα μεγέθη (1000 μέχρι 200000 ζεύγη βάσεων). Στη γενετική μηχανική τα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται ονομάζονται φορείς(vectors). Τα πλασμίδια έχουν τη δυνατότητα να πολλαπλασιάζονται ή να εκφράζουν συγκεκριμένα γονίδια. Το πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για παραγωγή πρωτεΐνης συζευγμένης με έξι ιστιδίνες (His Tag) που φέρει αλληλουχία αναγνώρισης για την πρωτεάση 3C, ονομάζεται pATHRA (Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας).

2.1.3 Διαλύματα

2.1.3.1 Θρεπτικά υλικά ανάπτυξης βακτηρίων

- LB Broth: 1% tryptone, 0.5% yeast extract και 0.17M sodium chloride.
- TB Broth: 1.2% tryptone ,2.4% γραμμάρια yeast extract, 0.4% Glycerol, 70mM K_2HPO_4 και 16mM KH_2PO_4 .

2.1.3.2 Ρυθμιστικά διαλύματα λύσης βακτηριακών κυττάρων

- Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 1: 0.1M Sodium Phosphate buffer (pH 6), 0.2M NaCl, 10% Glycerol, 0,1% MTG, 1mg/mL lysozyme, 1mM PMSF, 50U βενζονάση

Η προσθήκη του PMSF (αναστολέας πρωτεασών) και του MTG και της λυσοζύμης γίνεται λίγο πριν τη χρήση του διαλύματος. Η βενζονάση είναι ικανή να διασπά το δίκλωνο DNA, το γραμμικό DNA, το κυκλικό DNA και το μονόκλωνο RNA. Η λυσοζύμη (lysozyme) είναι ένα ένζυμο το οποίο καταλύει την υδρόλυση της πεπτιδογλυκάνης, η οποία είναι το κύριο συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος (Duckett, 1999).

Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 2: 50mM Sodium Phosphate buffer (pH8), 0.2M NaCl, 5 % Glycerol, 1mg/mL lysozyme, 1mM PMSF, 50U βενζονάση

2.1.3.3 Ρυθμιστικά διαλύματα Υγρής Χρωματογραφίας Συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC)

- Χρωματογραφία ιόντων Co

Ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης: 0.1M Phosphate Buffer, 0.2M NaCl, 0.1% MTG ρύθμιση έως pH 6.0

Ρυθμιστικό Διάλυμα έκλουσης: 0.1M Phosphate Buffer, 0.6M Imidazole, 0.2M NaCl, 0.1% MTG ρύθμιση έως pH 6.0

Διάλυμα διαπίδυσης: 0,1M Tris buffer (pH 8), 0.2M NaCl, 0.1% MTG, 0.5M Imidazole. Το διάλυμα αυτό, χρησιμοποιείται για την αλλαγή του pH του διαλύματος. Το δείγμα τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης και στη συνέχεια μέσα στο διάλυμα διαπίδυσης. Αναδεύεται 16 ώρες ώστε η αλλαγή του διαλύματος μέσω των πόρων της μεμβράνης να γίνει σταδιακά.

- Χρωματογραφία ιόντων Ni

Ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης: 50mM Sodium Phosphate buffer, 0.2M NaCl, 0.1M Imidazole έως pH 8.0

Ρυθμιστικό Διάλυμα έκλουσης: 50mM Sodium Phosphate buffer, 0.2M NaCl, 0.5M Imidazole έως pH 8.0

Dialysis buffer: 0,05 Phosphate Buffer, 0.2M NaCl

2.1.4 Ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες SDS-PAGE

2.1.4.1 Μέθοδος

Μέσω της ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνικών δειγμάτων μπορούμε να πάρουμε πληροφορίες σχετικά με τις φυσικές ιδιότητες τους αλλά και την ποσοτική εκπροσώπησή τους. Επίσης είναι δυνατόν να ταυτοποιηθούν και να ανιχνευθούν πρωτεΐνες μετά τον διαχωρισμό τους με ηλεκτροφόρηση.

Αρχικά πραγματοποιείται η προετοιμασία της πηκτής πολυακρυλαμιδίου, ανάλογα με την πρωτεΐνη που επιλέγεται να ανιχνευθεί κάθε φορά επιλέγεται η πυκνότητα της πηκτής που θα χρησιμοποιηθεί. Το ασυνεχές σύστημα ηλεκτροφόρησης αποτελείται από 2 πηκτές διαφορετικής πυκνότητας, την πηκτική επιστίβαξης και την πηκτική διαχωρισμού. Η πηκτική επιστίβαξης έχει σταθερή πυκνότητα 5% ενώ πηκτική διαχωρισμού εναλλάσσεται ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος (βλ. Πίνακας 2). Ο ρόλος της πηκτικής επιστίβαξης είναι να κινηθούν οι πρωτεΐνες και να στοιβαχτούν σε μια κοινή ζώνη ώστε να εισέλθουν ταυτόχρονα στην πηκτική διαχωρισμού. Στην πηκτική διαχωρισμού, η κίνηση των πρωτεϊνών περιορίζεται από την πηκτική καθώς το μέγεθος των πόρων του πλέγματος που δημιουργούνται αυξάνει τις διαφορές στην κινητικότητα μεταξύ πρωτεϊνών που διαφέρουν σε μέγεθος. Οι πηκτές σχηματίζονται από το συμπολυμερισμό του ακρυλαμιδίου και του δις-ακρυλαμιδίου. Ο πολυμερισμός επιτυγχάνεται μέσω της δράσης του υπερθειικού αμμωνίου (APS) και της τετραμεθυλοαιθυλοδιαμίνης (TEMED). Πιο συγκεκριμένα, το TEMED δημιουργεί σε αυτά τα είδη ακρυλαμιδίου ελεύθερες ρίζες και το APS πολυμερίζει αυτές τις ενεργοποιημένες ενώσεις φτιάχνοντας έτσι το πλέγμα. Το SDS είναι ένα απορρυπαντικό που χρησιμεύει στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών ώστε να ηλεκτροφορούνται μόνο με βάση το μοριακό τους βάρος. Με τη βοήθεια 2 τζαμιών δημιουργείται η κατασκευή της κάθετης πηκτής πολυ-ακρυλαμιδίου, ενώ οι θέσεις υποδοχής του δείγματος δημιουργούνται με τη προσθήκη μιας χτένας κατά την πήξη της πηκτικής επιστίβαξης. Μόλις η πηκτική είναι έτοιμη τοποθετείται στην κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x (Running Buffer 1x). Τα δείγματα προετοιμάζονται με ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων 4x και τοποθετούνται για 5min στους 95°C ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών που περιέχονται σε κάθε δείγμα. Αφού πραγματοποιείται η φόρτωση των δειγμάτων στα πηγάδια, ενώ σε ένα από τα πηγάδια φορτώνεται ο

μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέεται στο τροφοδοτικό το οποίο διαβιβάζει ρεύμα τάσης 120V (Gallagher, 2012).

Πίνακας 2 Σύσταση Πηκτής Διαχωρισμού και Επιστίβαξης

| Πηκτή διαχωρισμού | | Πηκτή επιστίβαξης | |
|-------------------------------|------------|-------------------------------|-----------|
| | 10% | | 5% |
| Μίγμα ακρυλαμιδίου 30% | 1.7 mL | Μίγμα ακρυλαμιδίου 30% | 0,5 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 |
| dH₂O | 1.9 mL | dH₂O | 2,1 mL |
| APS 10% | 50 μL | APS 10% | 30 μL |
| TEMED | 2 μL | TEMED | 3 μL |

2.1.4.2 Διαλύματα

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

250mM Tris, 1.92M Glycine (pH8-8.8) και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου. Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται Running Buffer 1x με κατάλληλη αραίωση (Shapiro et al., 1967). Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

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

500mM Tris-HCl pH 6.8, 40% Glycerol, 8% SDS, 5% β- mercaptoethanol, 0.04% Bromophenol Blue. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.

2.1.5 Χρώση με Coomassie

10% Acetic Acid, Coomassie Blue 0.05% (40% Methanol, 10% Acetic Acid, dH₂O, Coomassie Blue R-250 ~0.1%). Χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση πρωτεϊνών, έχει αρνητικό φορτίο και δεσμεύεται μη ειδικά στις πρωτεΐνες. Η πηκτική επωάζεται στο διάλυμα χρώσης, για να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες και να αποφευχθεί η διάχυσή τους. Η χρωστική δεσμεύεται σε πρωτεΐνες περίπου στοιχειομετρικά, έτσι αυτή η μέθοδος προτιμάται για τον ποσοτικό καθορισμό των πρωτεϊνών.

2.1.5.1 Χρώση με νιτρικό άργυρο ($AgNO_3$)

- Μονιμοποίηση: 50% Methanol, 5% Acetic Acid. Στο βήμα της μονιμοποίησης, οι πρωτεΐνες ακινητοποιούνται μην επιτρέποντας τη διάχυσή τους από την πηκτή κατά τη χρώση. Επίσης, με αυτό το βήμα, απομακρύνονται από την πηκτή ουσίες που επηρεάζουν τη χρώση, όπως το ρυθμιστικό διάλυμα, αποδιατακτικοί παράγοντες κ.α..
- Ευαισθητοποίηση: 0.02% $Na_2S_2O_3$: Αυτό το διάλυμα βοηθά τις πρωτεΐνες να αντιδράσουν με τον άργυρο και επιταχύνει την επακόλουθη αναγωγή του ιόντος του αργύρου.
- $AgNO_3$: 0.1% $AgNO_3$: Το οξυανιόν του θείου ($S_2O_3^{2-}$) από το προηγούμενο βήμα, σχηματίζει ένα σύμπλοκο με τα ελεύθερα ιόντα του αργύρου εμποδίζοντάς το να αναχθεί σε μεταλλικό άργυρο.
- Ανάπτυξη σήματος: 2% Na_2CO_3 , 0.04% Formaldehyde. Η φορμαλδεΐδη ανάγει τον άργυρο ενώ η ύπαρξη του ανθρακικού νατρίου είναι απαραίτητη για να γίνει το pH του διαλύματος αλκαλικό.
- Τερματισμός αντίδρασης: 5% Acetic acid. Η προσθήκη του οξικού οξέος σταματά την οξειδωση του αργύρου (Switzer et al., 1979, Chevallet et al., 2006).

2.1.6 Μελέτη ενζυμικής δραστηριότητας

2.1.6.1 Μέθοδος

Η εξέταση της ενζυμικής δραστηριότητας της AtHESPERIN έγινε σύμφωνα με τους Maryati, M., et al. (Maryati et al., 2014) με τροποποιήσεις. Χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα ένα μόριο RNA μήκους 17 βάσεων (5'- CCU UUC CAA AAA AAA AA -3') φέροντας στο 5' άκρο του τη φθορίζουσα χρωστική Cy3 ομοιοπολικά συνδεδεμένη με το υπόστρωμα. Το υπόστρωμα βρίσκεται διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης και στο διάλυμα αυτό, προστίθεται και το ένζυμο. Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 25°C και τερματίζεται με την προσθήκη ίσου όγκου 2x ρυθμιστικού διαλύματος δειγμάτων RNA και θέρμανση στους 85°C για 3min. Η αντίδραση αναλύεται σε πηκτή ακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες στα 200V.

Τα μόρια RNA που ηλεκτροφορούνται έχουν διαφορετική κινητικότητα μέσα στην πηκτή λόγω του μήκους τους. Έτσι, μόρια με μικρότερο μήκος λόγω της δράσης

του ενζύμου, έχουν υψηλότερη κινητικότητα από μόρια τα οποία είναι μεγαλύτερου μήκους. Τα προϊόντα της αντίδρασης οπτικοποιούνται με τη χρήση φίλτρου ανίχνευσης του φθορισμού της χρωστικής Cy3 μηχανήματος αρχειοθέτησης (Unitec, Cambridge, τμήμα Ιατρικής-Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας).

2.1.6.2 Διαλύματα

- Διάλυμα αντίδρασης: 50mM Sodium Citrate, 2mM MgCl₂, 100mM NaCl, 0.5mM DTT, 10% glycerol (pH 6.5), το DTT διατηρεί τους δισουλφιδικούς δεσμούς του ενζύμου σταθερούς κατά τη διάρκεια της αντίδρασης.
- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE 10×: 1M Tris, 1M Boric acid, 50mM EDTA. Οι σκόνες διαλύονται σε αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών (DEPC) και φιλτράρεται σε αποστειρωμένο μπουκάλι.
- Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων RNA 2× (Sample buffer): 95% φορμαμίδιο, 5mM EDTA, 0,025% SDS. Το φορμαμίδιο έχει δειχθεί πως αναστέλλει τη δράση των RNασών και βοηθά στη διατήρηση του RNA (Chomczynski, 1992). 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 δραστικότητα πολλών RNασών και η δέσμευσή τους από το EDTA δρα ανασταλτικά για τα ένζυμα αυτά (Brody and Kern, 2004).

2.2 Οργανολογία

Το τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας και το εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας παρέιχε όλα τα όργανα για την διεξαγωγή της παρούσας εργασίας.

| | |
|---|---|
| ΆΚΤΑ purifier (FPLC system) | GE Healthcare Life Sciences |
| Αυτόματες πιπέτες | Gilson |
| Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini PROTEAN® Tetra Cell | BioRad |
| Μετρητής pH | Metrohm |
| Σύστημα απεικόνισης | XR doc, BioRad Uvitec, Cambridge |
| Φυγόκεντροι | Centrifuge 5814R, eppendorf Z36HK, Hermle CR-22N Himac, HITACHI |
| Φασματοφωτόμετρο | VWR 1600-PC |
| Ογκυηναπο ρομπότ σάρωσης συνθηκών κρυστάλλωσης | Douglas Instruments |

2.3 Μεθοδολογία

2.3.1 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων BL21-Gold με πλασμιδιακό φορέα pATHRA

Πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli* BL21-Gold με τη μέθοδο του θερμικού σοκ (heat shock). Σε σωληνάριο τύπου eppendorf όπου ήταν αποθηκευμένα τα επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα έγινε προσθήκη 1μL ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pATHRA, ανάδευση και επώαση για 30min. Έπειτα για 45 δευτερόλεπτα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 42°C. Στη συνέχεια, μεταφέρονται για επώαση για 2min σε πάγο. Έπειτα προστίθενται 900μL αποστειρωμένο LB Broth χωρίς την παρουσία αντιβιοτικού. Τα μετασχηματισμένα βακτήρια επωάζονται στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm) για 1h.

Για να επιβεβαιώσουμε τον μετασχηματισμό των βακτηριακών στελεχών BL21-Gold, πραγματοποιούμε καλλιέργεια με στερεό θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με το κατάλληλο αντιβιοτικό (αμπικιλίνη). Δηλαδή, με την ολοκλήρωση της επώασης, επιστρώνουμε 50μL σε τρυβλία petri με θρεπτικό μέσο LB Agar, στα οποία έχει προστεθεί το κατάλληλο αντιβιοτικό. Τα τρυβλία επωάζονται overnight σε θερμοκρασία 37°C στα 210 rpm.

Όλες οι προαναφερθείσες διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν υπό στείρες συνθήκες.

2.3.2 Παραγωγή της ανασυνδυασμένης AtHESPERIN

Μια μικρή καλλιέργεια 50 mL που εμβολιάστηκε με 1 αποικία που έχει αναπτυχθεί μετά το μετασχηματισμό, και κατόπιν χρησιμοποιήθηκε για να εμβολιστούν 3 L αποστειρωμένου υγρού θρεπτικού μέσου σε αναλογία 1/100 και επωάζονται στους 37°C με συνεχή ανάδευση (210rpm), αφού έχει προστεθεί κατάλληλη συγκέντρωση από το αντιβιοτικό (50μg/ml). Η διαδικασία της ανάπτυξης των βακτηρίων παρακολουθείται φασματοφωτομετρικά. Η επώαση θεωρείται ολοκληρωμένη όταν η οπτική απορρόφηση της ήταν $A_{600nm}=0.6-0.7$ (περίπου μετά από 3 ώρες) όπου θεωρείται ότι η καλλιέργεια βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης.

Ακολούθησε επαγωγή της υπερέκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Με προσθήκη του επαγωγέα (IPTG) 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 φυγοκεντρήθηκε και το υπερκείμενο που αποτελούνταν από το θρεπτικό υλικό απορρίφθηκε. Τα κυτταρικά ιζήματα αποθηκεύτηκαν στους -80 °C μέχρι τη λύση τους.

2.3.3 Λύση βακτηριακών κυττάρων

Το κυτταρικό ίζημα, αφού αποψύχθηκε ελαφρώς σε πάγο για πιο εύκολη μεταχείριση, διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης και αφού ομογενοποιήθηκε, προστέθηκε Βενζονάση και επωάστηκε σε πάγο για 20 λεπτά ανακατεύοντας ανά διάστημα 5 λεπτών. Η πλήρης λύση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με χρήση υπερήχων, η οποία έγινε σε 9 κύκλους των 20 sec ενώ το κυτταρόλυμα βρίσκεται σε πάγο. Η συσκευή υπερήχων για 20 sec παράγει υπερήχους σε εύρος 75%, σε συνεχόμενους κύκλους, ενώ για 20 sec σταματάει την παραγωγή υπερήχων. Αυτό συμβαίνει διότι κατά την εφαρμογή υπερήχων αυξάνεται η θερμοκρασία του διαλύματος. Μετά το πέρας της μηχανικής λύσης, το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 45000xg/4°C για 45 λεπτά. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, γίνεται διαχωρισμός του υπερκείμενου το οποίο αποτελείται από το διάλυμα των πρωτεϊνών, από το κυτταρικό ίζημα και φιλτράρεται με τη βοήθεια φίλτρου 0,45μm.

2.3.4 Απομόνωση της AtHESPERIN με χρωματογραφία αγχιστείας ακινητοποιημένων μετάλλων (IMAC)

Πρωτεΐνες και πεπτιδία όπως η AtHESPERIN που εμφανίζουν συγγένεια με ιόντα μετάλλων, λόγω της προστιθέμενης ετικέτας αγχιστείας έξι ιστιδινών στο αμινοτελικό τη άκρο, μπορούν να απομονωθούν χρησιμοποιώντας χρωματογραφία αγχιστείας ακινητοποιημένων μετάλλων. Η ιστιδίνη (His) σχηματίζει σύμπλοκα με τα ιόντα μετάλλων σε τιμές pH 6-7 και η περιεκτικότητα μιας πρωτεΐνης σε ιστιδίνες ευθύνεται για την πρόσδεση της πρωτεΐνης αυτής σε ένα ιόν μετάλλου (Porath, 1992). Τα υλικά χρωματογραφίας IMAC μπορεί να εμπλουτιστούν με ιόντα μετάλλων, όπως νικέλιο, ψευδάργυρος, χαλκός, ασβέστιο, κοβάλτιο ή σίδηρος. Η αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη-στόχο εξαρτάται από το pH και την ιοντική ισχύ. Τα μόρια που έχουν προσδεθεί, συνήθως εκκλύονται με αύξηση της ιοντικής ισχύος του ρυθμιστικού διαλύματος ή με την προσθήκη ιμιδαζολίου στο ρυθμιστικό διάλυμα (Bornhorst and Falke, 2011).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε στήλη με ιόντα κοβαλτίου (Talor crude, Cytiva) και ιόντα νικελίου (HisTrap FF, Cytiva). Σε κάθε περίπτωση ο όγκος στήλης ήταν 1ml και εξισορροπείται με τουλάχιστον 10 όγκους στήλης (cv) από το αντίστοιχο διάλυμα. Ρυθμίζοντας την πίεση και το ρυθμό ροής, η AtHESPERIN, περνάει μέσα από τη στήλη, ώστε να μπορεί να προσδεθεί μέσω του His-Tag στα ιόντα μετάλλου, ενώ ό,τι δεν είναι ειδικό να εκπλυθεί στα κλάσματα υπερδιηθήματος (flow-through). Ακολούθως, συνεχίζει η έκπλυση του υλικού χρωματογραφίας με τουλάχιστον 5 cv. Τέλος, ακολουθεί η έκλυση της πρωτεΐνης, η οποία γίνεται με βαθμίδωση συγκέντρωσης (0- 100%) του διαλύματος έκλυσης.

2.3.4.1 Αφαίρεση ετικέτας αγχιστείας μέσω πέψης με πρωτεάση 3C

Οι ετικέτες αγχιστείας είναι ιδιαίτερα σημαντικές στην παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών καθώς μέσω αυτών μπορούμε να απομονώσουμε και να ταυτοποιήσουμε τις πρωτεΐνες που τις φέρουν. Παρά τη χρησιμότητά τους, μπορεί να επέμβουν στη βιολογική δράση της πρωτεΐνης. Συνεπώς πρέπει να αφαιρεθεί η ετικέτα αγχιστείας προς αποφυγή προβλημάτων σε μετέπειτα πειραματικές διεργασίες. Για να πραγματοποιηθεί αυτό, χρησιμοποιούνται ένζυμα τα οποία ονομάζονται πρωτεάσες (Waugh, 2005).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η ενδοπρωτεάση 3C. Η πρωτεάση αυτή έχει αυστηρή εξειδίκευση ως προς την αλληλουχία που αναγνωρίζει δηλαδή την αλληλουχία LEVLFQ/GP. Η καρβοξυ- πλευρά του δεσμού της 3C πρωτεάσης είναι υπεύθυνη για τη μη απομάκρυνση της μαζί με την ετικέτα αγκιστείας (Waugh, 2005). Στην παρούσα εργασία η πρωτεάση 3C είναι επίσης συντηγμένη με ετικέτα αγκιστείας HisTag το οποίο μας δίνει τη δυνατότητα να την απομακρύνουμε από το πρωτεϊνικό διάλυμα με καθαρισμό. Η θέση αναγνώρισης της πρωτεάσης υπήρχε στον φορέα που χρησιμοποιήθηκε. Μετά τον καθαρισμό της πρωτεΐνης από τη στήλη αγκιστείας, η πρωτεΐνη αναμιγνύεται με την πρωτεάση 3C. Μόλις αναμιχθούν τα διαλύματα των πρωτεϊνών, αναδεύονται και επωάζονται για 16 ώρες στους 4°C για να ολοκληρωθεί η αντίδραση πέψης.

Με το πέρας της αντίδρασης, το δείγμα φορτώνεται στη στήλη αγκιστείας IMAC και απομονώνονται τα κλάσματα υπερδιηθήματος, όπου αναμένεται να εμπεριέχεται η AtHESPERIN, χωρίς την παρουσία της ετικέτας αγκιστείας, και στα κλάσματα έκλουσης απομονώνεται η HisTag-3C αλλά και πιθανή AtHESPERIN της οποίας η ετικέτα HisTag δεν απομακρύνθηκε με την πέψη. Εάν χρησιμοποιείται πρωτεάση 3C συντηγμένη με ετικέτα αγκιστείας GST, τότε το βήμα αφαίρεσης της πρωτεάσης και της άκοπης πρωτεΐνης από το διάλυμα πραγματοποιείται με χρωματογραφία αγκιστείας GST και όχι IMAC. Η ύπαρξη AtHESPERIN η οποία φέρει ετικέτα αγκιστείας στο κλάσμα υπερδιηθήματος μαζί με τη φυσικού τύπου AtHESPERIN (χωρίς ετικέτα) ανιχνεύεται με ανοσοαποτύπωση κατά Western (βλ. παρακάτω).

2.3.5 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Μετά την απομόνωση της πρωτεΐνης από τη στήλη, πραγματοποιήθηκε η μέθοδος Bradford. Η μέθοδος αυτή είναι φασματομετρική και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης. Στηρίζεται στην αλλαγή του χρώματος της χρωστικής (Coomassie Blue G) όταν υπάρχουν μόρια πρωτεΐνης στο διάλυμα (Kruger, 1994). Για τη χρήση της μεθόδου κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη με τη βοήθεια πρωτεϊνικών διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης: για το κάθε ένα από αυτά μετράμε την οπτική πυκνότητα (σε μήκος κύματος 595nm).

2.3.6 Συμπύκνωση και διαπίδυση της AtHESPERIN

Μετά την ολοκλήρωση της απομόνωσης της πρωτεΐνης, αυτή συμπυκνώνεται και υποβάλλεται σε διαπίδυση για την αλλαγή διαλύματος ανάλογα με τις αναλύσεις που θα ακολουθήσουν σε επόμενα βήματα. Οι βασικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν μετά την απομόνωση ήταν οι εξής: α) αφαίρεση της ετικέτας αγγιστείας και β) προσδιορισμός της ενζυμικής δραστικότητας. Η διαδικασία της συμπύκνωσης πραγματοποιείται για όλες ανεξαιρέτως τις μετέπειτα διαδικασίες σε φίλτρα φυγοκεντρικής συμπύκνωσης (Amicon ultra 4). Η διαπίδυση, μπορεί να συνδυαστεί με τη συμπύκνωση εάν χρησιμοποιούνται φίλτρα φυγοκεντρικής συμπύκνωσης είτε να πραγματοποιηθεί ξεχωριστά με τη χρήση μεμβράνης διαπίδυσης.

α) αφαίρεση της ετικέτας αγγιστείας: Μετά το πρώτο βήμα καθαρισμού, η AtHESPERIN βρίσκεται στο διάλυμα έκλουσης από τη στήλη IMAC. Το διάλυμα αυτό περιέχει μεταξύ άλλων, υψηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου, το οποίο σαν συστατικό δεν επηρεάζει τη δραστικότητα της πρωτεάσης 3C, αλλά δυσχεραίνει την απομάκρυνση αυτής μετά την αντίδραση πέψης. Για τον παραπάνω λόγο, πραγματοποιείται διαπίδυση σε ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο δεν έχει ιμιδαζόλιο, έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί απομόνωση της AtHESPERIN που δε φέρει HisTag σε επόμενο βήμα καθαρισμού, όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.3.4.1.

β) προσδιορισμός της ενζυμικής δραστικότητας: Μετά το πρώτο βήμα καθαρισμού, η AtHESPERIN βρίσκεται στο διάλυμα έκλουσης από τη στήλη IMAC. Το διάλυμα αυτό, δεν είναι το κατάλληλο για την ενζυμική δραστικότητα της AtHESPERIN, και ως εκ τούτου πρέπει να αντικατασταθεί από το διάλυμα αντίδρασης το οποίο περιγράφεται στην παράγραφο 2.1.6.2.

2.3.7 Ανοσοαποτύπωμα πρωτεϊνών κατά Western

Οι πρωτεΐνες μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου ηλεκτρομεταφέρονται σε μεμβράνη PVDF, στην επιφάνεια της οποίας προσδένονται (Mishra et al., 2017). Πριν την τοποθέτηση της μεμβράνης προστίθεται μεθανόλη απευθείας πάνω σε αυτή λόγω της υδροφοβικής φύσης του υλικού PVDF. Με την ολοκλήρωση της μεταφοράς χρησιμοποιήσαμε χρωστική Ronsseau S για να μπορούμε να διακρίνουμε το κατά πόσο είναι επιτυχής η μεταφορά των πρωτεϊνών. Με την μεταφορά των πρωτεϊνών στην μεμβράνη, ξεκινά η διαδικασία της ανοσολογικής ανίχνευσής. Για την ταυτοποίηση

στηριζόμαστε στην πρόσδεση αντισωμάτων, συνεπώς είναι σημαντικό να αποφύγουμε το ενδεχόμενο μη ειδικής σύνδεσης.

Αρχικά, η μεμβράνη επωάζεται με διάλυμα κορεσμού (blocking buffer) το οποίο αποτελείται από 5% άπαχο γάλα σε σκόνη διαλυμένο σε PBS-0.1% Tween 20 (PBST) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του γάλακτος και να αποφύγουμε μη ειδική πρόσδεση του αντισώματος στη μεμβράνη. Στη συνέχεια, επώασαμε με το πρωτογενές αντίσωμα το οποίο είναι ειδικό για την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος σε κατάλληλη αραίωση. Πιο συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε πρωτογενές αντίσωμα μυός έναντι της ετικέτας αγχιστείας HisTag σε αραίωση 1:5000 διαλυμένο σε PBST. Μετά το πέρας της επώασης με το πρωτογενές αντίσωμα, ξεπλύνουμε τη μεμβράνη 3 φορές για να απομακρύνουμε το μη προσδεμένο αντίσωμα και προσθέσαμε το δευτερογενές αντίσωμα. Το δευτερογενές αντίσωμα αναγνωρίζει τη σταθερή περιοχή του πρωτογενούς και μετά από πλύσεις ακολουθεί η ανίχνευση του σήματος μέσω χημειοφωταύγειας.

2.3.8 Κρυσταλλογραφία ακτινών X

Οι πρωτεΐνες, όπως και πολλά άλλα μόρια, έχουν την ιδιότητα, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες να σταθεροποιούνται σε μια συγκεκριμένη γεωμετρική διεύθυνση, τους κρυστάλλους. Οι κρύσταλλοι είναι η στερεή μορφή ενός διαλύματος και αποτελούνται από επαναλαμβανόμενα συμμετρικά μοτίβα συνδεδεμένα με ομοιοπολικούς δεσμούς. Η κρυστάλλωση πρωτεϊνών είναι μία βιοχημική μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη δομική μελέτη μορίων με ακτίνες X. Για τα πειράματα κρυστάλλωσης είναι απαιτούμενη η μέγιστη δυνατή καθαρότητα της πρωτεΐνης. Η θέση του κάθε ατόμου περιγράφεται με τις τρισδιάστατες καρτεσιανές συντεταγμένες x , y και z . Η μονάδα όγκου του κρυσταλλικού πλέγματος είναι η στοιχειώδης κυψελίδα, που είναι περιορισμένη να έχει σχήματα τα οποία εάν μετατοπιστούν σε επαναλαμβανόμενο σχηματισμό να έχουν την καλύτερη δυνατή τοποθέτηση στο χώρο. Στη στοιχειώδη κυψελίδα μπορεί να βρίσκεται ένα ή περισσότερα μόρια. Τα μόρια εντός της στοιχειώδους κυψελίδας, τα οποία δεν παρουσιάζουν στοιχεία συμμετρίας, καθιστούν την ασύμμετρη μονάδα η οποία είναι εκείνη που θα προσδώσει τις ιδιότητες του κρυστάλλου. Τα μόρια-ομάδες μορίων της ασύμμετρης μονάδας ενός κρυστάλλου, διαθέτουν την ίδια στερεοδιάταξη, συνεπώς η δομή της ασύμμετρης μονάδας επεξηγεί την δομή όλου του κρυστάλλου. Οι αποστάσεις των

ατόμων της κρυσταλλικής δομής αντιστοιχούν στο μήκος κύματος των ακτινών Χ. Δηλαδή η κρυσταλλική δομή έχει την ικανότητα περίθλασης των ακτινών Χ. Η απορρόφηση των ακτινών Χ από το άτομο ενός μορίου του κυτταρικού πλέγματος καθορίζεται από την θέση των γειτονικών ατόμων του ίδιου μορίου στο πλέγμα. Ο προσδιορισμός της δομής της προς εξέταση πρωτεΐνης δίδεται από τα διαγράμματα περίθλασης. Τα διαγράμματα περίθλασης είναι διαγράμματα που απεικονίζουν τους διαφορετικούς προσανατολισμούς σε σχέση με την διεύθυνση της δέσμης των ακτινών Χ.

2.3.8.1 Ανάπτυξη κρυστάλλων

Ανάπτυξη κρυστάλλων Η ανάπτυξη των κρυστάλλων προϋποθέτει πως το διάλυμα της πρωτεΐνης πρέπει να μετατοπιστεί από την διαλυτή φάση στην ζώνη πυρήνωσης και να παραμένει εκεί για αρκετό χρονικό διάστημα για τον σχηματισμό των κρυσταλλικών πυρήνων. Η ανάπτυξη των πυρήνων αποτελεί ίσως το σημαντικότερο βήμα για τον σχηματισμό των κρυστάλλων. Στη συνέχεια οι κρυσταλλικοί πυρήνες μεγαλώνουν σε μέγεθος ώστε να σχηματίσουν μεγάλους καλοσχηματισμένους κρυστάλλους οι οποίοι είναι ιδανικοί και προαπαιτούμενοι για τις κρυσταλλογραφικές μελέτες, με αποτέλεσμα την μείωση της συγκεντρωσής της πρωτεΐνης. Ωστόσο, η πολύ γρήγορη μείωση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο διάλυμα μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό μη ειδικών συσσωματωμάτων ή και μετουσίωση της πρωτεΐνης και να σχηματίσει άμορφο ίζημα στο διάλυμα προς μελέτη. Για το λόγο αυτό, η διαδικασία της κρυστάλλωσης γίνεται σταδιακά με την μεταβολή διαφόρων βαθμιαίων παραγόντων όπως είναι η συγκέντρωση, η ιοντική ισχύς ή το pH του διαλύματος. Υπάρχουν διάφορες ουσίες, όπως είναι τα άλατα τα οποία έχουν την δυνατότητα να οδηγήσουν σε κατακρήμνιση των πρωτεϊνών ενός διαλύματος μέσω της διαδικασίας της εξαλάτωσης. Κάποιοι οργανικοί διαλύτες μπορούν επίσης να προκαλέσουν κατακρήμνιση πρωτεϊνών σε ένα διάλυμα. Ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο μέσο κατακρήμνισης είναι το υδατοδιαλυτό πολυμερές της πολυαιθυλενικής γλυκόλης (PEG). Η PEG έχει την ιδιότητα να κατακρημνίζει αποτελεσματικά τις πρωτεΐνες χωρίς ωστόσο να τις μετουσιώνει. Ένας ακόμη αποτελεσματικός τρόπος να κατακρημνιστεί μια πρωτεΐνη ενός διαλύματος είναι να προστεθεί σε υδατικό διάλυμα πρωτεΐνης, κατακρημνιστική ουσία, έως ότου η συγκέντρωση του κατακρημνιστικού να είναι ακριβώς μικρότερη της συγκέντρωσης κατακρήμνισης. Μετέπειτα, το νερό του διαλύματος αφήνεται να εξατμιστεί μέχρι η συγκέντρωση του κατακρημνιστικού να αυξηθεί αρκετά ώστε να προκαλέσει την

κατακρήμνιση της πρωτεΐνης. Ο σχηματισμός ενός καλοσχηματισμένου κρυστάλλου εξαρτάται από τις ιδιότητες του διαλύματος όπως είναι η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, το pH, η θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς. Η επίτευξη των απαιτούμενων συνθηκών για την ικανοποιητική παραγωγή κρυστάλλων απαιτεί πολλές δοκιμές οι οποίες στη μελέτη αυτή επιτυγχάνονται με την χρήση ρομπότ κρυσταλλώσεων. Τα ρομπότ κρυσταλλώσεων προγραμματίζονται ώστε να επιτευχθεί η πραγματοποίηση πολλών δοκιμών διαφορετικών συνθηκών δοκιμών διαφορετικών συνθηκών.

2.3.8.2 Τεχνικές Κρυστάλλωσης

-Τεχνική άμεσης προσθήκης του παράγοντα κατακρήμνισης

Η τεχνική άμεσης προσθήκης του παράγοντα κατακρήμνισης χρησιμοποιείται κατά κόρον στην κρυστάλλωση ενζύμων όπως η ριβονουκλεάση και τα ένζυμα της οικογένειας των θρυψινών. Τα ένζυμα διαλύονται σε διάλυμα χαμηλής ιοντικής ισχύος ώστε η απόδοση της συγκέντρωσης να είναι υψηλή, με χρήση άλατος ή οργανικού διαλύτη εωσότου επέλθει υπερκορεσμός του διαλύματος και να σχηματιστούν οι κρύσταλλοι.

Τεχνική εξάτμισης και διάχυσης ατμών Η τεχνική εξάτμισης και διάχυσης ατμών χρησιμοποιείται για την κρυστάλλωση μικρότερων μορίων. Η τεχνική βασίζεται στην αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης του διαλύματος μέσω της εξάτμισης του διαλύτη. Ωστόσο δεν θεωρείται κατάλληλη για πρωτεΐνες διότι δεν είναι δυνατός ο έλεγχος της διαδικασίας, ενώ η εξάτμιση μπορεί να οδηγήσει σε κρυστάλλωση των αλάτων.

Τεχνική κρεμάμενης σταγόνας Η τεχνική της κρεμάμενης σταγόνας ομοιάζει την αρχή της τεχνικής εξάτμισης και διάχυσης ατμών. Η διάχυση ατμών στο σύστημα αυτό οδηγεί στην σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο πρωτεϊνικό διάλυμα με αποτέλεσμα τον σχηματισμό κρυστάλλων.

Περίθλαση ακτινών X

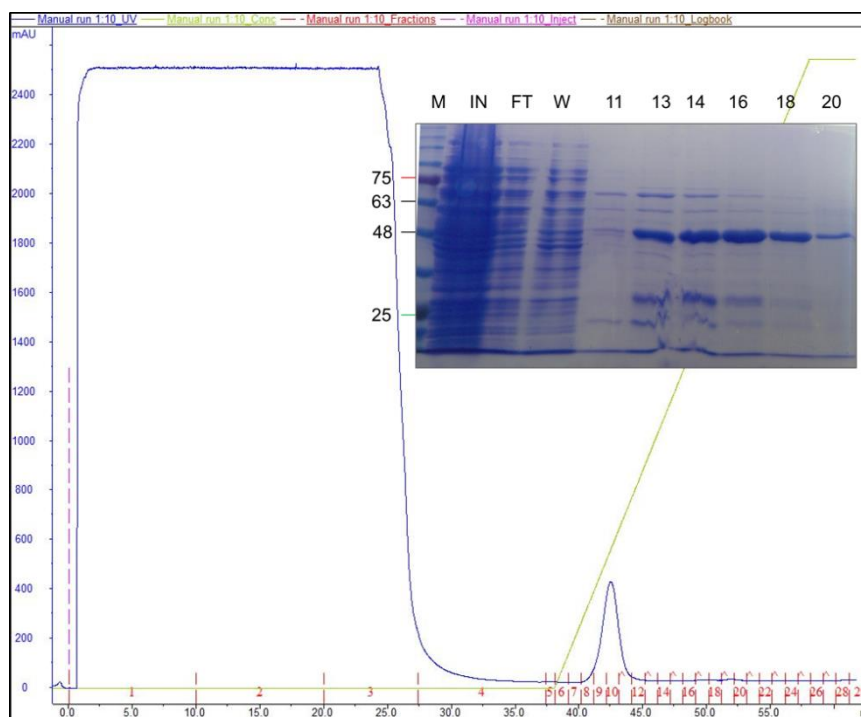
Όπως προαναφέρθηκε, για τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής μια πρωτεΐνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ιδιότητά τους να περιθλούν τις ακτίνες X. Με την πραγματοποίηση της κρυστάλλωσης δημιουργούνται κρύσταλλοι υψηλής ευκρίνειας. Οι κρύσταλλοι τοποθετούνται ενδιάμεσα μιας πηγής ακτινών X και ενός

ανιχνευτή ακτινών X. η πηγή παράγει τις ακτίνες X οι οποίες διαπερνούν τον κρύσταλλο και διαθλούν τις ακτίνες X σε ένα ανιχνευτή ακτινών X όπως για παράδειγμα ένα φιλμ ακτινών X. Τα άτομα του κρυστάλλου ανακλούν τις ακτίνες όπως περιγράφηκε παραπάνω δίνοντας έτσι μια συγκεκριμένη πρόβλεψη της δομής του κρυστάλλου.

3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

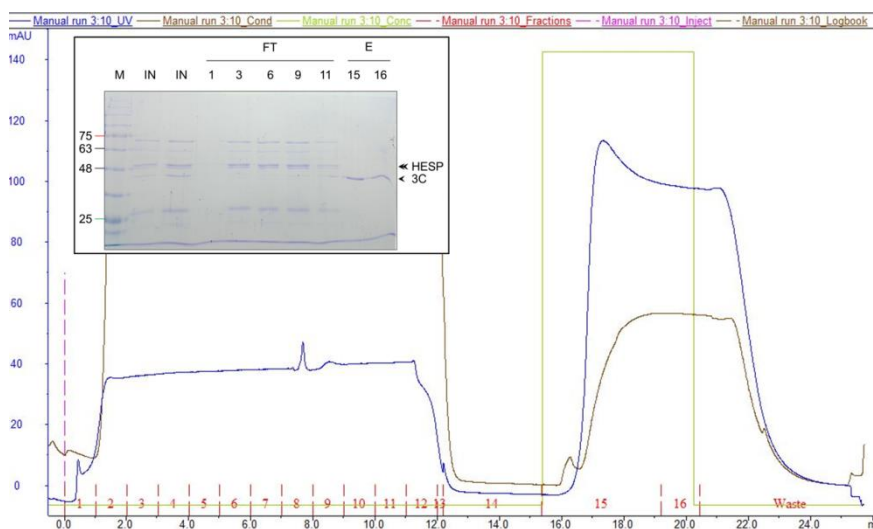
3.1 Βέλτιστες συνθήκες απομόνωσης της AtHESPERIN

Σε συνέχεια προηγούμενων μελετών του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημεία και Βιοτεχνολογίας, έγινε προσπάθεια αύξησης της απόδοσης της απομόνωσης της AtHESPERIN. Αρχικά, η απομόνωση της AtHESPERIN πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία αγκιστείας ακινητοποιημένων μετάλλων κοβαλτίου, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.3.4. Η έκλουση της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με βαθμίδωση συγκέντρωσης 1-100% του διαλύματος έκλουσης. (Εικόνα 5). Με το πέρας της έκλουσης πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πυκνότητας 10%.



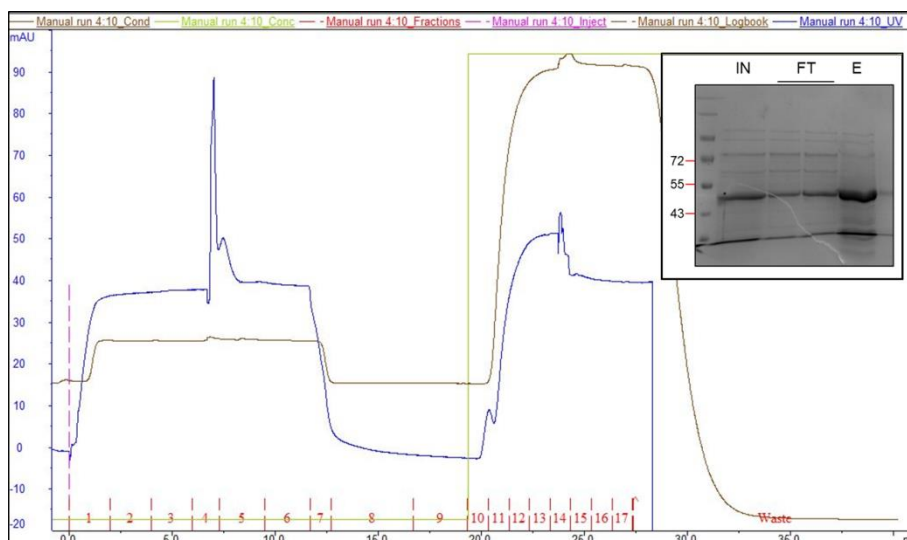
Εικόνα 5 Χρωματογράφημα από τη στήλη κοβαλτίου της πρωτεΐνης AtHESP (Talon crude, Cytiva). Ένθετο (δεξιά): Ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πυκνότητας 10%. Διαδρομές: M, δείκτες μοριακής μάζας· IN, input· FT, Flow through· W, εκπλύσεις (wash)· 11, 13, 14, 16, 18, 20, αριθμοί κλασμάτων. Οι δείκτες μοριακής μάζας δίνονται στα αριστερά της πηκτής.

Η εκλουσμένη πρωτεΐνη, συλλέχθηκε μετά την απομόνωση με FPLC, επωάστηκε με την πρωτεάση 3C-GST όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.3.4.1. Η τελευταία, όπως αναφέρθηκε, διαθέτει εξειδίκευση για την πέψη της σηματοδοτικής ετικέτας HisTag. Για την απομάκρυνση της πρωτεάσης 3C-GST από το διάλυμα πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία αγκιστείας GST, ώστε η πρωτεάση να προσδεθεί σε αυτή και να συλλεχθούν τα δείγματα υπερδιηθήματος, όπου αναμένεται να περιέχεται η AtHESPERIN με και χωρίς την HisTag, καθώς δεν αναμένεται να αλληλεπιδρά με τη στήλη GST.



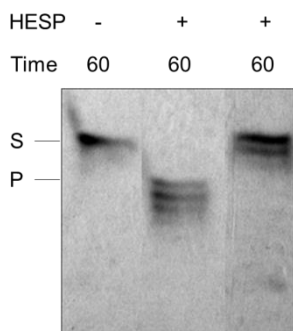
Εικόνα 6 Χρωματογράφημα στήλης αγκιστείας GST. Η κόκκινη κάθετος αντιπροσωπεύει την εισαγωγή δείγματος πρωτεϊνών στη στήλη. Η πράσινη κάθετος καταδεικνύει την αρχή της έκλουσης της πρωτεΐνης. Ένθετο: Ανάλυση των εκλουσμένων πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Διαδρομές: M, δείκτες μοριακής μάζας· IN, input· FT, Flow through· W, εκπλύσεις (wash)· E, έκλουση (elution)· 1, 3, 6, 9, 11, 15, 16, αριθμοί κλασμάτων. Οι δείκτες μοριακής μάζας δίνονται στα αριστερά της πηκτής.

Τέλος, για να γίνει ο διαχωρισμός της AtHESPERIN με και χωρίς HisTag, πραγματοποιήθηκε ακόμη μια IMAC. Στο στάδιο αυτό, συλλέγεται το υπερδιήθημα όπου αναμένεται να βρίσκεται η AtHESPERIN χωρίς HisTag, ενώ το ποσοστό της AtHESPERIN που φέρει το HisTag προσδένεται και εκλύεται από τη στήλη. Στη διάρκεια αυτών των βημάτων καθαρισμού, παρατηρείται μεγάλη απώλεια πρωτεΐνης, ενώ σε δυο επαναλήψεις της απομόνωσης ο μέσος όρος απόδοσης της απομόνωσης είναι 0,2 mg AtHESPERIN ανά L καλλιέργειας βακτηρίων.



Εικόνα 7 Αφαίρεση της επικέτας αγχιστείας. Χρωματογράφημα στήλης αγχιστείας GST. 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. IN, input· FT, Flow through· E, έκλουση (elution). Οι δείκτες μοριακής μάζας δίνονται στα αριστερά της πηκτής.

Επιπλέον, η αποτελεσματικότητα της απομόνωσης της AtHESPERIN ελέγχεται και με πραγματοποίηση προσδιορισμού της ενζυμικής της δραστηριότητας. Φαίνεται, πως με τη συγκεκριμένη διαδικασία απομόνωσης το ένζυμο χάνει τη δραστηριότητά του Εικόνα 8, υποδηλώνοντας πως πρέπει να βελτιστοποιηθούν περαιτέρω οι διαδικασίες της απομόνωσης.

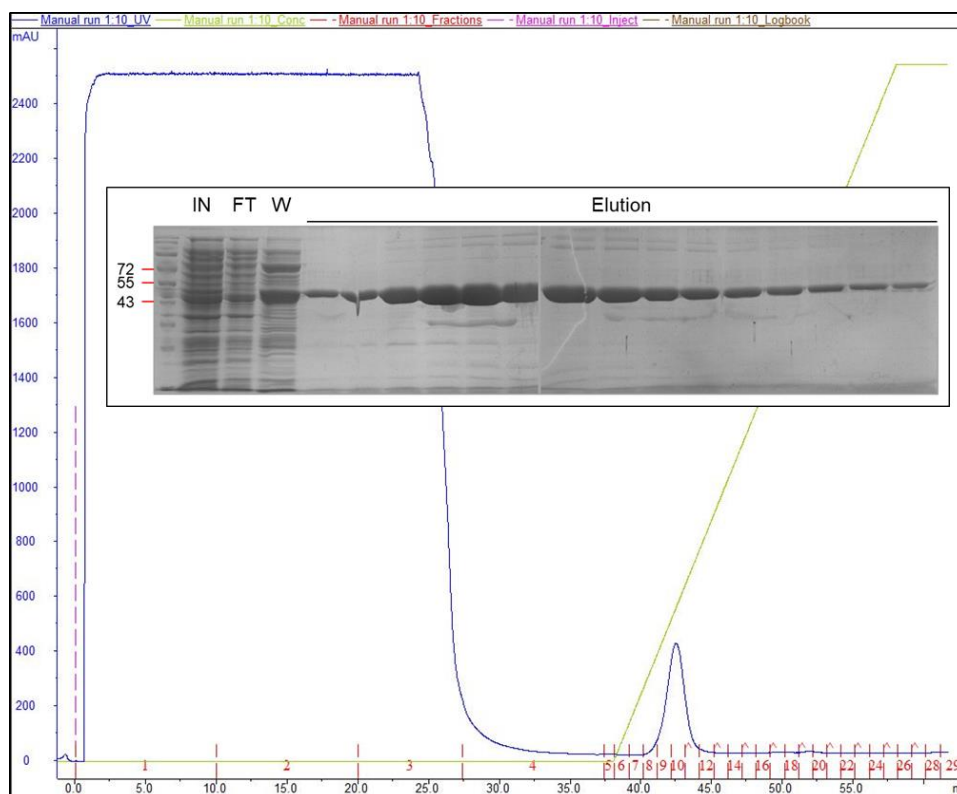


Εικόνα 8 Έλεγχος ενζυμικής δραστηριότητας της AtHESPERIN. Στην πρώτη διαδρομή φαίνεται το υπόστρωμα, στη μεσαία φαίνεται η αποικοδόμηση του υποστρώματος από την AtHESPERIN (παιλιότερη παρασκευή) και στην τελευταία διαδρομή φαίνεται η AtHESPERIN μετά από την απομόνωσή της από στήλη ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε 20% ακρυλαμίδιο, παρουσία 8M ουρίας.

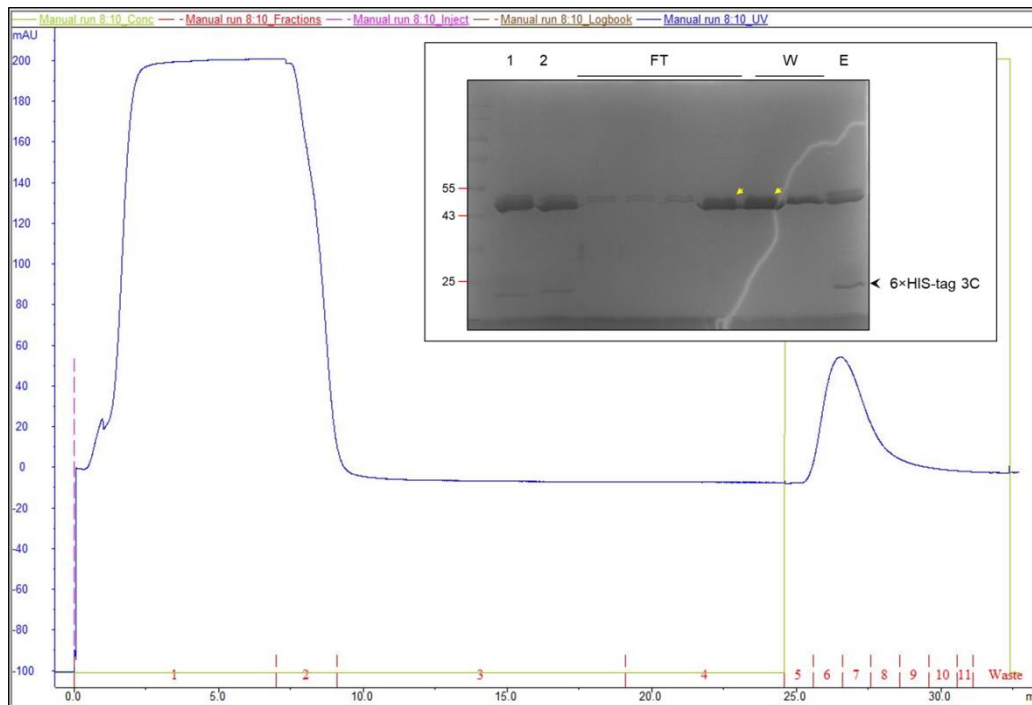
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η διαδικασία της απομόνωσης βελτιστοποιήθηκε επιπλέον, αρχικά με την αλλαγή του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας

κατά την υπερέκφραση της AtHESPERIN. Επιπλέον, κατά τη διαδικασία απομόνωσης χρησιμοποιήθηκε στήλη IMAC ιόντων νικελίου και τέλος μειώθηκαν τα στάδια απομόνωσης κατά ένα, με τη χρήση πρωτεάσης 3C η οποία έφερε ετικέτα αγκιστείας HisTag, με αποτέλεσμα στο στάδιο όπου απομακρύνεται η πρωτεάση από το δείγμα της πρωτεΐνης να απομακρύνεται και η πρωτεΐνη που φέρει HisTag.

Πιο συγκεκριμένα, στην Εικόνα 9 φαίνεται η απομόνωση της AtHESPERIN από τη στήλη νικελίου, ενώ στην Εικόνα 10. φαίνεται η απομόνωση της καθαρής AtHESPERIN μετά την πέψη με την πρωτεάση 3C-HisTag.

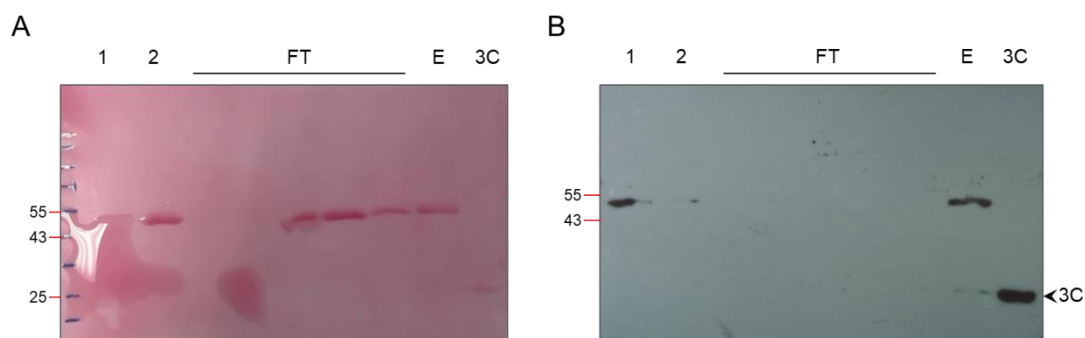


Εικόνα 9 Χρωματογράφημα από τη στήλη Νικελίου της πρωτεΐνης AtHESP (Histrap FF). Ένθετο: Ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτική πυκνότητας 10%. IN, input· FT, Flow through· W, εκπλύσεις (wash). Αριστερά της πηκτής φαίνονται οι δείκτες μοριακής μάζας.



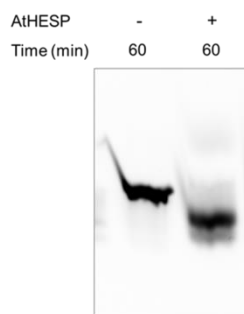
Εικόνα 10 Χρωματογράφημα στήλης αγχιστείας GST. Η κόκκινη κάθετος αντιπροσωπεύει την εισαγωγή δείγματος πρωτεϊνών στη στήλη. Η πράσινη κάθετος καταδεικνύει την αρχή της έκλουσης της πρωτεΐνης. Ένθετο: Ανάλυση των εκλουσμένων πρωτεϊνών σε πηκτική πολυακρυλαμίδιου. Οι δείκτες μοριακής μάζας δίνονται στα αριστερά της πηκτής.

Για την επιβεβαίωση της καθαρότητας του δείγματος της AtHESPERIN που δε φέρει HisTag από πρόσμιξη της άκοπτης AtHESPERIN, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά western ώστε να συλλεχθούν τα σωστά κλάσματα. Η απόδοση της απομόνωσης υπολογίστηκε σε 0,5mg πρωτεΐνης ανά L καλλιέργειας βακτηρίων.



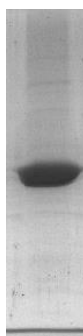
Εικόνα 11 Ανοσοσύτπωση κατά Western για τα δείγματα που συλλέχθηκαν. A. χρώση της μεμβράνης με Ponceau S. B. φιλμ μετά την εμφάνιση της ίδιας μεμβράνης όπως στο A. 1, AtHESPERIN με His-Tag. 2, AtHESPERIN πριν τη στήλη αφαίρεσης της πρωτεάσης 3C. FT, Flow through. E, έκλουση (Elution). 3C. Η θέση της 3C δείχνεται με την αιχμή του βέλους στα δεξιά της πηκτής (B). Οι δείκτες μοριακής μάζας δίνονται στα αριστερά των πηκτών.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ενζυμικής δραστηριότητας. Παρατηρήθηκε ικανοποιητική αποικοδόμηση ενός υποστρώματος RNA από την AtHESPERIN, όπως φαίνεται από την Εικόνα 12. Το υπόστρωμα RNA είναι ένα 17μερές ριβονουκλεοτιδίων με αλληλουχία 5'- CCU UUC CAA AAA AAA AA -3', που φέρει τη φθορίζουσα χρωστική CY3 στο άκρο 5' του.



Εικόνα 12 Ηλεκτροφόρηση 20% ακρυλαμιδίου-8M ουρίας. Η διάρκεια αντίδρασης παρουσία (+) ή απουσία (-) AtHESPERIN είναι 60'. S, υπόστρωμα RNA· P, προϊόν αντίδρασης

Η καθαρότητα της πρωτεΐνης μετά τη συμπύκνωση προσδιορίζεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου 10%. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης αυτής φαίνονται στην Εικόνα 13.



Εικόνα 13 Ανάλυση της συμπυκνωμένης πρωτεΐνης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% μετά από όλα τα στάδια καθαρισμού.

Συνολικά, από τις παραπάνω διαδικασίες βελτιστοποίησης των διαδικασιών απομόνωσης της AtHESPERIN, καταλήγουμε στο συμπέρασμα, πως με την αλλαγή του θρεπτικού μέσου κατά την υπερέκφραση, με τη χρήση στήλης χρωματογραφίας ακινητοποιημένων ιόντων νικελίου, αλλά και με τη μείωση των βημάτων καθαρισμού κατά ένα, το οποίο έγινε εφικτό με τη χρήση της πρωτεάσης 3C που φέρει HisTag, έγινε δυνατή η απομόνωση της πρωτεΐνης σε ικανή ποσότητα, καθαρότητα και

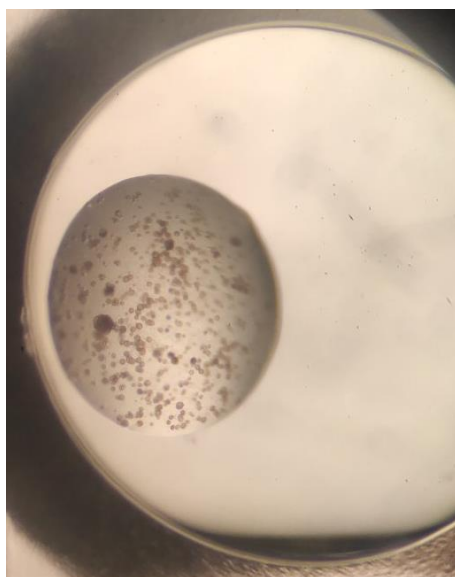
έχοντας διατηρήσει την ενζυμική της δραστικότητα ώστε να συνεχίσουμε με δομικές μελέτες. Στον παρακάτω πίνακα, φαίνονται συνολικά οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν και η συνολική απόδοση της διαδικασίας απομόνωσης.

Πίνακας 3. Συνοπτική περιγραφή των διάφορων συνθηκών της διαδικασίας απομόνωσης της AtHESPERIN.

| Θρεπτικό μέσο | Είδος στήλης | Απόδοση mg HESP/L καλλιέργειας | Αριθμός σταδίων καθαρισμού |
|---------------|------------------|--------------------------------|----------------------------|
| LB Broth | Co ²⁺ | 0.2 | 4 |
| TB Broth | Ni ²⁺ | 0.5 | 3 |

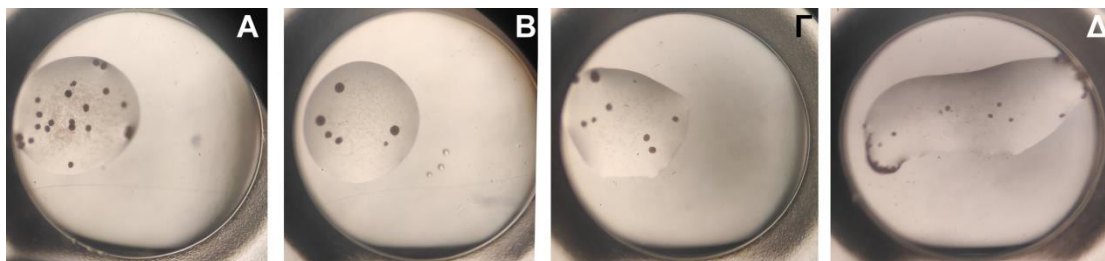
3.2 Εξέταση συνθηκών κρυστάλλωσης

Εφόσον πραγματοποιήθηκε απομόνωση της AtHESPERIN σε ικανή ποσότητα και καθαρότητα, έγιναν οι πρώτες προσπάθειες για αναζήτηση συνθηκών κρυστάλλωσης. Η βέλτιστη συγκέντρωση της πρωτεΐνης για δοκιμασία κρυστάλλωσης εκτιμήθηκε με το με το *pre-crystallization test* της εταιρείας *Hampton Research* το οποίο πραγματοποιήθηκε σε δυο συνθήκες θερμοκρασίας (22°C και 16 °C). Οι συνθήκες που επιλέχθηκαν ήταν συγκέντρωση πρωτεΐνης 5,7mg/ml και θερμοκρασία 16 °C. Κατόπιν, εξετάστηκαν 96 συνθήκες κρυστάλλωσης του kit Structure Screen 1 + 2 (Molecular Dimensions). Οι συνθήκες, τοποθετήθηκαν σε τριβλίο καθήμενης σταγόνας με 50μl διάλυμα reservoir, όγκο σταγόνας 0,4 μl σε αναλογία 2:1 πρωτεΐνη προς διάλυμα reservoir. Το τριβλίο αφέθηκε να επωαστεί για 24 ώρες στους 16°C και παρατηρούνταν στο στερεοσκόπιο κάθε 48-72 ώρες ενώ συνέχιζε η επώαση στους 16°C. Μετά από 7 ημέρες επώασης στους 16°C, παρατηρήθηκε σχηματισμός κρυστάλλων με μορφή σφαιρουλιτών (Εικόνα 14) στη συνθήκη B11 (0.2 M Calcium chloride dihydrate, 0.1 M Sodium HEPES 7.5, 28 % v/v PEG 400). Οι κρύσταλλοι σφαιρουλίτη δεν είναι καλής ποιότητας για πειράματα περίθλασης ακτίνων-X, αλλά αποτελούν σημαντικό σημείο αφετηρίας της βελτιστοποίησης των συνθηκών κρυστάλλωσης.



Εικόνα 14. Συνθήκη του Structure Screen 1 +2 όπου παρατηρήθηκαν σφαιρουλίτες.

Στην προσπάθεια βελτιστοποίησης των συνθηκών κρυστάλλωσης, πραγματοποιήθηκε δοκιμή της ίδιας συνθήκης με αλλαγή της τιμής pH του διαλύματος. Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκε η ίδια συνθήκη σε διαλύματα με pH 4.5, 5.5, 6.5 και 7.5. Η ποιότητα των κρυστάλλων δεν βελτιώθηκε, καθώς όπως φαίνεται και στην Εικόνα 15, σχηματίστηκαν και πάλι σφαιρουλίτες.



Εικόνα 15. Δοκιμασία συνθηκών βελτιστοποίησης κρυστάλλων μορφής σφαιρουλιτών. Α. pH 4.5, Β. pH 5.5, Γ. pH 6.5, Δ. pH 7.5 (B11).

Το γεγονός πως οι κρύσταλλοι δεν βελτιώθηκαν με την αλλαγή συνθηκών, αλλά ούτε και διαφοροποιήθηκαν, μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως ίσως δεν αποτελούσαν κρυστάλλους AtHESPERIN, αλλά κρυστάλλους του χλωριούχου ασβεστίου που αποτελεί συστατικό της συνθήκης B11 και βάσει αυτής πραγματοποιήθηκαν οι επιπλέον δοκιμασίες.

Η μόνη πιθανή δομή της AtHESPERIN προέρχεται από μελέτες μοντελοποίησης (modeling) βασιζόμενες στη μεγάλη ομολογία της καταλυτικής περιοχής της

AtHESPERIN με τη CNOT6L, μια απαδενυλάση της οποίας η δομή είναι γνωστή (Beta et al., 2020). Χρειάζονται επιπλέον δοκιμές σχηματισμού κρυστάλλων εξετάζοντας άλλες συνθήκες, όπως με διαφοροποίηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης, και να ληφθούν κρύσταλλοι κατάλληλης ποιότητας για πειράματα περίθλασης ακτίνων-Χ.

Βιβλιογραφία

- Avello, P. A., Davis, S. J., Ronald, J. & Pitchford, J. W. 2019. Heat the Clock: Entrainment and Compensation in Arabidopsis Circadian Rhythms. *J Circadian Rhythms*, 17, 5.
- Beta, R. a. A. & Balatsos, N. a. A. 2018. Tales around the clock: Poly(A) tails in circadian gene expression. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, e1484.
- Beta, R. a. A., Kyritsis, A., Douka, V., Papanastasi, E., Rizouli, M., Leonidas, D. D., Vlachakis, D. & Balatsos, N. a. A. 2020. Biochemical and in silico identification of the active site and the catalytic mechanism of the circadian deadenylase HESPERIN. *FEBS Open Bio*.
- Bornhorst, B. J. & Falke, J. J. 2011. Reprint of: Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *Protein Expr Purif*.
- Brody, J. R. & Kern, S. E. 2004. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. *Anal Biochem*, 333, 1-13.
- Chevallet, M., Luche, S. & Rabilloud, T. 2006. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat Protoc*, 1, 1852-8.
- Chomczynski, P. 1992. Solubilization in formamide protects RNA from degradation. *Nucleic Acids Res*, 20, 3791-2.
- Cooke, A., Prigge, A. & Wickens, M. 2010. Translational repression by deadenylases. *J Biol Chem*, 285, 28506-13.
- Dehlin, E., Wormington, M., Korner, C. G. & Wahle, E. 2000. Cap-dependent deadenylation of mRNA. *EMBO J*, 19, 1079-86.
- Delis, C., Krokida, A., Tomatsidou, A., Tsikou, D., Beta, R. A., Tsioumpkou, M., Moustaka, J., Stravodimos, G., Leonidas, D. D., Balatsos, N. A. & Papadopoulou, K. K. 2016. AtHESPERIN: a novel regulator of circadian rhythms with poly(A)-degrading activity in plants. *RNA Biol*, 13, 68-82.
- Duckett, S. 1999. Ernest Duchesne and the concept of fungal antibiotic therapy. *Lancet*, 354, 2068-71.
- Edmonds, M. & Abrams, R. 1960. Polynucleotide biosynthesis: formation of a sequence of adenylate units from adenosine triphosphate by an enzyme from thymus nuclei. *J Biol Chem*, 235, 1142-9.
- Funakoshi, Y., Doi, Y., Hosoda, N., Uchida, N., Osawa, M., Shimada, I., Tsujimoto, M., Suzuki, T., Katada, T. & Hoshino, S. 2007. Mechanism of mRNA deadenylation: evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases. *Genes Dev*, 21, 3135-48.
- Gallagher, S. R. 2012. One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. *Curr Protoc Protein Sci*, Chapter 10, Unit 10 1 1-44.
- Goldstrohm, A. C. & Wickens, M. 2008. Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 337-44.
- Harnisch, C., Moritz, B., Rammelt, C., Temme, C. & Wahle, E. 2012. Activity and Function of Deadenylases. *Enzymes*, 31, 181-211.
- Kojima, S., Sher-Chen, E. L. & Green, C. B. 2012. Circadian control of mRNA polyadenylation dynamics regulates rhythmic protein expression. *Genes Dev*, 26, 2724-36.
- Kruger, N. J. 1994. The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol*, 32, 9-15.

- Lima, S. A., Chipman, L. B., Nicholson, A. L., Chen, Y. H., Yee, B. A., Yeo, G. W., Collier, J. & Pasquinelli, A. E. 2017. Short poly(A) tails are a conserved feature of highly expressed genes. *Nat Struct Mol Biol*, 24, 1057-1063.
- Maryati, M., Kaur, I., Jadhav, G. P., Olotu-Umoren, L., Oveh, B., Hashmi, L., Fischer, P. M. & Winkler, G. S. 2014. A fluorescence-based assay suitable for quantitative analysis of deadenylase enzyme activity. *Nucleic Acids Res*, 42, e30.
- McClung, C. R. 2006. Plant circadian rhythms. *Plant Cell*, 18, 792-803.
- Mishra, M., Tiwari, S. & Gomes, A. V. 2017. Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. *Expert Rev Proteomics*, 14, 1037-1053.
- Morf, J., Rey, G., Schneider, K., Stratmann, M., Fujita, J., Naef, F. & Schibler, U. 2012. Cold-inducible RNA-binding protein modulates circadian gene expression posttranscriptionally. *Science*, 338, 379-83.
- Nelson, D. L., Coxm.M. 2017. *Lehninger principles of biochemistry*, New York, NY, W.H. Freeman.
- Phillips, T. A., Vanbogelen, R. A. & Neidhardt, F. C. 1984. Ion gene product of Escherichia coli is a heat-shock protein. *J Bacteriol*, 159, 283-7.
- Porath, J. 1992. Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expr Purif*, 3, 263-81.
- Robles, M. S., Cox, J. & Mann, M. 2014. In-vivo quantitative proteomics reveals a key contribution of post-transcriptional mechanisms to the circadian regulation of liver metabolism. *PLoS Genet*, 10, e1004047.
- Roviello, G. N., Musumeci, D., Roviello, V., Pirtskhalava, M., Egoyan, A. & Mirtskhulava, M. 2015. Natural and artificial binders of polyriboadenylic acid and their effect on RNA structure. *Beilstein J Nanotechnol*, 6, 1338-47.
- Ryan, K., Calvo, O. & Manley, J. L. 2004. Evidence that polyadenylation factor CPSF-73 is the mRNA 3' processing endonuclease. *RNA*, 10, 565-73.
- Saez, L., Meyer, P. & Young, M. W. 2007. A PER/TIM/DBT interval timer for Drosophila's circadian clock. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 72, 69-74.
- Shapiro, A. L., Vinuela, E. & Maizel, J. V., Jr. 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun*, 28, 815-20.
- Switzer, R. C., 3rd, Merril, C. R. & Shifrin, S. 1979. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 98, 231-7.
- Tarun, S. Z., Jr. & Sachs, A. B. 1996. Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J*, 15, 7168-77.
- Waugh, D. S. 2005. Making the most of affinity tags. *Trends Biotechnol*, 23, 316-20.