



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

*Διπλωματική εργασία*  
**ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ AtHESPERIN»**



**ΒΕΡΟΝΙΚΗ Δ. ΔΟΥΚΑ**

**Λάρισα 2020**



**UNIVERSITY OF THESSALY**  
**SCHOOL OF HEALTH SCIENCES**  
**FACULTY OF BIOCHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY**

*Diploma thesis*

**«Biochemical characterisation of AtHESPERIN»**



**VERONIKI D. DOUKA**

**Larissa 2020**

**Διπλωματική εργασία**

**«ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ AtHESPERIN»**

**Diploma thesis**

**«BIOCHEMICAL CHARACTERISATION OF AtHESPERIN»**

**Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή**

➤ **Δρ Μπαλατσός Νικόλαος**, (επιβλέπων καθηγητής)  
Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, ΤΒΒ, Π.Θ.

➤ **Δρ Λεωνίδας Δημήτριος**  
Καθηγητής Βιοχημείας, ΤΒΒ, Π.Θ.

➤ **Δρ Παπαδοπούλου Καλλιόπη**  
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, ΤΒΒ, Π.Θ.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, από το Νοέμβριο του 2016 έως το Δεκέμβριο του 2017, υπό την επίβλεψη του Επικ. Καθηγητή Βιοχημείας Δρ. Νικόλαου Μπαλατσού.

## ***Ευχαριστίες***

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους συντέλεσαν στη διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους καθηγητές της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον επιβλέποντα καθηγητή, Δρ Νικόλαο Μπαλατσό, το Δρ Δημήτριο Λεωνίδα, και την Δρ Καλλιόπη Παπαδοπούλου, για την εμπιστοσύνη και τις συμβουλές που μου παρείχαν. Ειδικότερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα του τμήματος Ραφαηλία Μπέτα για τη σωστή καθοδήγηση, τη γνώση, την υποστήριξη και την εξαιρετική παρέα της, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για τη συνεργασία και τη συντροφικότητά τους. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου και ιδιαίτερα, την οικογένειά μου για την υποστήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

# Περιεχόμενα

<b>I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	6
<b>II. ABSTRACT</b> .....	6
<b>1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	7
1.1 Το κερκάδιο ρολόι στα φυτά.....	7
1.2 Συμμεταγραφικές τροποποιήσεις.....	9
1.2.1 Απαδενυλίωση .....	10
1.2.2 Απαδενυλάσες.....	11
1.3 Η Hesperin.....	12
<b>2 ΣΚΟΠΟΣ</b>	
<b>3 ΥΛΙΚΑ &amp; ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	16
3.1 Υλικά.....	16
3.1.1 Αντιδραστήρια.....	16
3.1.2 Βακτηριακά στελέχη .....	17
3.1.3 Πλασμιδιακοί φορείς .....	17
3.1.4 Δείκτες Μοριακών Βαρών .....	18
3.1.5 Ένζυμα .....	18
3.1.6 Υγρή Χρωματογραφία .....	19
3.1.7 Διαλύματα.....	19
3.1.8 Οργανολογία .....	24
3.2 Μέθοδοι.....	24
3.2.1 Παρασκευή επιδεκτικών προς χημικό μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων.....	24
3.2.2 Μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηρίων με τον επιθυμητό πλασμιδιακό φορέα ...	25
3.2.2 Υπερέκφραση της AtHESP από τα κύτταρα BL21-Gold (DE3) & Rosetta 2.....	25
3.2.4 Λύση βακτηριακών κυττάρων .....	26
3.2.5 Απομόνωση της AtHESP .....	26
3.2.6 Ηλεκτροφόρηση.....	29
3.2.7 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών από πηκτική πολυακρυλαμίδιου σε μεμβράνη PVDF .....	30
3.2.8 Ανοσοανίχνευση.....	31
3.2.9 Κινητικές μελέτες .....	32
<b>4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	34
4.1 Βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου απομόνωσης της AtHESP.....	34
4.1.1 Δοκιμασία διαφορετικών συνθηκών απομόνωσης της 6xHis-AtHESP .....	34
4.1.2 Απομόνωση των μεταλλαγμένων μορφών της AtHESP .....	40
4.2 Κινητικές μελέτες.....	42
4.2.1 Μελέτη της καταλυτικής δραστηριότητας της wt-AtHesp .....	42
4.2.2 Η επίδραση του 5'-AMP και της Νεομυκίνης Β στη δραστηριότητα της AtHesp.....	42
4.2.3 Μελέτη της καταλυτικής δραστηριότητας μεταλλαγμένων μορφών της AtHESP .....	43
<b>5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	44
<b>6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	48

## ***I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ***

Η Hesperin (AtHESP) από το φυτό *Arabidopsis thaliana*, είναι μια πρόσφατα χαρακτηρισμένη απαδενυλάση, οποία διέπεται από κερκάδια ρύθμιση και το γονίδιο της παρουσιάζει ομολογία με αυτό της Noctunin, των θηλαστικών. Πρόκειται για ένα αλλοστερικό και ολιγομερές ένζυμο, με μάζα 47 kDa, το οποίο μπορεί να αποδομεί αποτελεσματικά τις πολύ(A) ουρές των ευκαρυωτικών mRNA, καθορίζοντας έτσι τη διάρκεια ζωής τους και κατ' επέκταση τα επίπεδα των παραγόμενων πρωτεϊνών. Το γονίδιο της AtHESP παρουσιάζει μέγιστα επίπεδα έκφρασης κατά τις απογευματινές ώρες και παρότι δεν αποτελεί τμήμα του κεντρικού κερκάδιου μηχανισμού στο *A.thaliana*, φαίνεται να επηρεάζει τη ρυθμική έκφραση των γονιδίων του κεντρικού ταλαντωτή *TOC1* και *CCA1*. Η παρούσα εργασία εστιάζεται στη βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου απομόνωσης του ενζύμου, ώστε να διευκολυνθεί η μελέτη της δομής και της κινητικής συμπεριφοράς του.

## ***II. ABSTRACT***

Hesperin (AtHESP) from the *Arabidopsis thaliana* plant, is a recently identified deadenylase which shows circadian regulation and its gene is homologous to the mammalian Nocturnin gene. It is an allosteric and oligomeric enzyme, with molecular mass of 47 kDa, which can efficiently degrade the poly(A) tails of eukaryotic mRNAs, thereby determining their lifespan and thus the levels of protein produced. The AtHESP gene exhibits peak expression levels in the afternoon and although it's not a part of the circadian central mechanism in *A. thaliana*, it appears to affect the rhythmic expression of the central oscillator *TOC1* and *CCA1* genes. This work focuses on optimization of the enzyme isolation protocol to facilitate the study of its structure and kinetic behavior.

# **1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

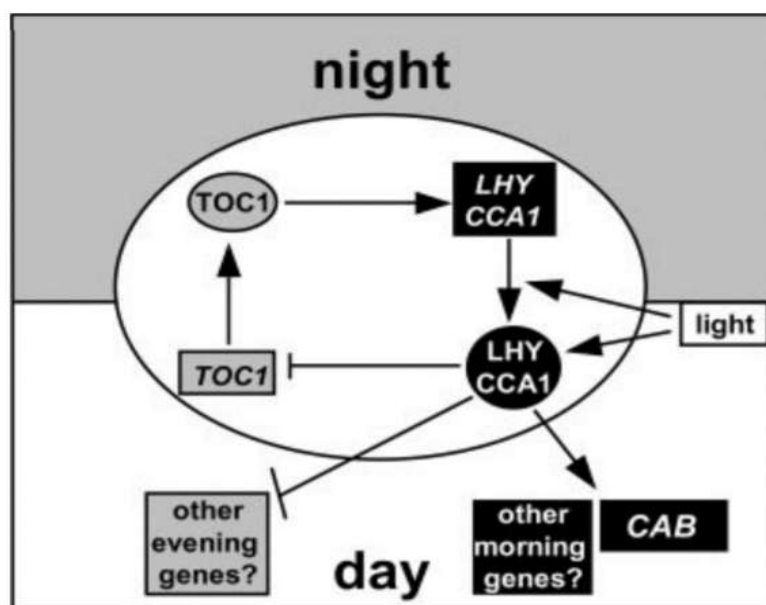
## **1.1 Το κερκάδιο ρολόι στα φυτά**

Η περιστροφή της γης γύρω από τον άξονά της προκαλεί προβλέψιμες αλλαγές στο γεωφυσικό περιβάλλον, δίνοντας έτσι στους οργανισμούς τη δυνατότητα να ακολουθούν τις μεταβολές του χρόνου και του χώρου. Οι περισσότεροι οργανισμοί (βακτήρια, φυτά, θηλαστικά, κ.α.) το επιτυγχάνουν, χρησιμοποιώντας ακριβείς βιολογικούς μηχανισμούς που μπορούν να μετρήσουν την πάροδο του χρόνου με μια κλίμακα ~24 ωρών. Οι μηχανισμοί αυτοί είναι γνωστοί ως κερκάδια ρολόγια [1]. Ο όρος κερκάδιος προέρχεται από την λατινική φράση «circa diem» που σημαίνει «κατά τον κύκλο, κατά τη διάρκεια μίας ημέρας».

Τα συστήματα αυτά χαρακτηρίζονται από 3 κύρια στοιχεία: Τα βιοχημικά μονοπάτια εισόδου, τον κεντρικό ταλαντωτή και το μονοπάτι εξόδου. Ο βασικός μηχανισμός του ταλαντωτή είναι καλά συντηρημένος και οι διαδικασίες μεταγραφής και μετάφρασης των γονιδίων του κεντρικού ταλαντωτή ελέγχονται μέσω αυτορρυθμιζόμενων, διασυνδεδεμένων βρόχων ανατροφοδότησης, που με τη σειρά τους ρυθμίζουν την περαιτέρω έκφραση γονιδίων-στόχων καθοδικά του μονοπατιού [2]. Με άλλα λόγια, τα κερκάδια ρολόγια είναι ενδογενείς αυτοσυντηρούμενοι ταλαντωτές που καθοδηγούν μια ευρέως φάσματος ρυθμική έκφραση γονιδίων, εναρμονίζοντας έτσι το μεταβολισμό και τη φυσιολογία [3].

Τα κερκάδια ρολόγια είναι πολυάριθμα και υφίστανται σε διάφορα επίπεδα οργάνωσης και πολυπλοκότητας, γεγονός που υποδηλώνει ότι πρέπει να προσφέρουν ένα σημαντικό προσαρμοστικό πλεονέκτημα στους οργανισμούς. Φαίνεται να ενισχύουν την έμφυτη ικανότητα των οργανισμών να επιβιώνουν κάτω από το συνεχώς μεταβαλλόμενο περιβάλλον, επιτρέποντάς τους να προβλέπουν αποτελεσματικά τα περιοδικά γεγονότα, όπως η διαθεσιμότητα φαγητού, του φωτός και των συντρόφων [1]. Όσον αφορά στα φυτά, για παράδειγμα, οι εποχιακοί ρυθμοί ρυθμίζονται από τη διάρκεια της ημέρας, ένα φαινόμενο που ονομάζεται φωτοπεριοδισμός, και τους επιτρέπει να απαντούν με κατάλληλες μεταβολές στην ανάπτυξη και τη μορφολογία, όπως η ανάπτυξη βλαστών και φύλλων ή δημιουργία άνθων στη πιο κατάλληλη χρονική περίοδο για την εξασφάλιση της αναπαραγωγής. Στην πραγματικότητα, το φαινόμενο αυτό ρυθμίζεται από ένα εσωτερικό ρολόι, το οποίο φυσιολογικά, είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση σταθερών ρυθμών καθημερινά. Η μεταβολή σημαντικών περιβαλλοντικών παραμέτρων, όπως η διάρκεια της ημέρας ή η θερμοκρασία, επάγει τον επαναπρογραμματισμό του κερκάδιο ρολογιού, έτσι ώστε να ακολουθεί τις μεταβολές του φυσικού περιβάλλοντος [4, 5].

Πρόσφατες έρευνες έχουν φανερώσει αρκετά στοιχεία, όσον αφορά τους μοριακούς μηχανισμούς που αποτελούν το κερκάδιο ρολόι, αλλά δεν είναι πλήρως κατανοητός ο τρόπος με τον οποίο ο κερκάδιος ταλαντωτής ερμηνεύεται σε ένα τέτοιο εύρος ρυθμικών βιολογικών διαδικασιών [6]. Μελέτες που αφορούν στο μοριακό μηχανισμό του ρολογιού του φυτού *Arabidopsis thaliana* έδειξαν ότι ο κερκάδιος ταλαντωτής στα φυτά ορίζεται από έναν κεντρικό βρόγχο ανάδρασης που συνδέει τις δύο φάσεις πρωί-βράδυ (βλ. Εικόνα 1).



**Εικόνα 1.** Το μοντέλο του κεντρικού ταλαντωτή στο *Arabidopsis Thaliana*. Το πρωινό φως ενεργοποιεί την έκφραση των γονιδίων *CCA1* και *LHY*, τα οποία επάγουν την έκφραση των γονιδίων *CAB*, και πιθανόν και άλλων γονιδίων. Ταυτόχρονα, καταστέλλεται η έκφραση του *TOC1* και πιθανότατα άλλων βραδινών γονιδίων. Η μείωση της έκφρασης των *LHY* και *CCA1*, επιτρέπουν την αύξηση των επιπέδων μεταγραφής του *TOC1*. Η *TOC1*, φαίνεται να αυξάνει την έκφραση των *LHY* και *CCA1*, οι οποίοι φθάνουν τα μέγιστα επίπεδα την αυγή, επιτρέποντας στον κύκλο να ξεκινήσει από τη αρχή [7].

Ο μηχανισμός αυτός βασίζεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο εκφραζόμενων γονιδίων κατά τις πρωινές ώρες, τα οποία κωδικοποιούν υψηλά συντηρημένους μεταγραφικούς παράγοντες Myb, τους *CCA1* (CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1) και *LHY* (LATE ELONGATED HYPOCOTYL) που αποτελούν τα αρνητικά στοιχεία του βρόχου, με το γονίδιο *TOC1* (Timing of CAB expression 1), που εκφράζεται κατά τις βραδινές ώρες και λειτουργεί ως θετικός ρυθμιστής του βρόχου. Κατά την αυγή, το φως ενεργοποιεί την έκφραση των γονιδίων *CCA1* και *LHY*, τα οποία με τη σειρά τους επάγουν την έκφραση των γονιδίων *CAB*, καθώς και πιθανότατα άλλων γονιδίων που ακολουθούν τη φάση έκφρασης του *CAB*. Ταυτόχρονα, καταστέλλεται η έκφραση του *TOC1* και πιθανότατα άλλων βραδινών γονιδίων. Η προοδευτική μείωση της έκφρασης των *LHY* και *CCA1* κατά τη διάρκεια της ημέρας, επιτρέπουν την αύξηση των επιπέδων μεταγραφής του *TOC1* και την επίτευξη των μέγιστων επιπέδων στο τέλος της ημέρας, όταν τα επίπεδα έκφρασης των *LHY* και *CCA1* είναι



χαμηλότερα από ποτέ. Η *TOC1*, είτε άμεσα είτε έμμεσα, φαίνεται να αυξάνει την έκφραση των *LHY* και *CCA1*, οι οποίοι φθάνουν τα μέγιστα επίπεδα την αυγή, επιτρέποντας στον κύκλο να ξεκινήσει από τη αρχή [7].

Συνοψίζοντας, τρία βασικά γονίδια, τα *CCA1-LHY*, και *TOC1*, ρυθμίζουν τον κεντρικό ταλαντωτή του *A.thaliana*, σε μεταγραφικό επίπεδο μέσω ενός καλά χαρακτηρισμένου κατασταλτικού μηχανισμού, ο οποίος έχει πρόσφατα εμπλουτιστεί [2]. Στον παρακάτω πίνακα, αναφέρονται τα σημαντικότερα γονίδια του κεντρικού ταλαντωτή στο *A.thaliana* και ο ρόλος τους συνοπτικά [8].

<b>CCA1-LHY</b>	Οι Circadian Clock Associated 1 (CCA1) και Late Elongated Hypocotyl (LHY) είναι Myb-σχετιζόμενοι μεταγραφικοί παράγοντες. Αυτό το ετεροδιμερές ενεργοποιεί τη μεταγραφή των PRR7 και PRR9, ενώ η έκφραση των γονιδίων <i>cca1</i> και <i>lhy</i> καταστέλλεται από αυτούς και τις συγγενείς τους πρωτεΐνες (CCA1 and LHY).
<b>TOC1</b>	To Timing of CAB expression 1 (TOC), γνωστό και ως PRR1, είναι μέλος της σχετιζόμενης με το κικκάδιο ρολόι οικογένειας γονιδίων PSEUDORESPONSE REGULATOR (PRR). Ο TOC1 είναι ένας μεταγραφικός ενεργοποιητής των CCA1 and LHY.
<b>ZTL</b>	Η Zeitlupe (ZTL) είναι μια πρωτεΐνη F-box, η οποία στοχεύει την TOC1 το βράδυ, για αποδόμηση από το πρωτεόσωμα. Η ZTL δεν παρουσιάζει ρυθμική έκφραση.
<b>LUX/PCL1</b>	Ο Lux Arrhythmo/PhytoClock1 (LUX/PCL1) είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας MYB. Πρόκειται για έναν αρνητικό ρυθμιστή του ίδιου του καθώς και της έκφρασης των PRR9, TOC1 και του υποκινητή του.
<b>ELF3</b>	Ο Early Flowering 3 (ELF3) είναι ένας μεταγραφικός ρυθμιστής που ενεργοποιεί έμμεσα το CCA1:LHY, δρώντας ως ένας αρνητικός ρυθμιστής των PRR7, PRR9 και ELF3.
<b>ELF4</b>	Early Flowering 4 (ELF4). Οι ELF3 και ELF4 λειτουργούν ως μεταγραφικοί καταστολείς των PRR7 και PRR9. Σε συνεργασία με τον LUX σχηματίζουν το Evening Complex που συντονίζουν περιβαλλοντικά και ενδογενή σήματα.

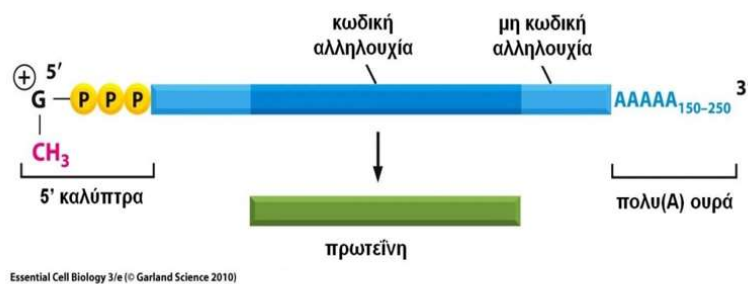
**Πίνακας 1.** Τα σημαντικότερα γονίδια του κεντρικού ταλαντωτή στο *A.thaliana*.

Επιπλέον, μετά-μεταγραφικοί και μετά-μεταφραστικοί μηχανισμοί καθώς και ο μετασχηματισμός της χρωματίνης είναι κρίσιμα στοιχεία για τη διατήρηση του κικκάδιου ρυθμού στα ευκαρυωτικά ρολόγια. Μεταξύ αυτών των ρυθμιστικών μηχανισμών, η σταθερότητα και ο ρυθμός αποδόμησης των mRNAs που εμπλέκονται στο κικκάδιο σύστημα παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρυθμική έκφραση των μεταγράφων [2].

## 1.2 Συμμεταγραφικές και μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις

Στον πυρήνα, η επεξεργασία ενός νεοσυντιθέμενου mRNA συνοδεύεται από την προσθήκη μίας πολυ(A) ουράς, αποτελούμενης από μια ακολουθία 80-250 αδενυλικών καταλοίπων, στο 3' άκρο του και μιας καλύπτρας στο 5' άκρο του (βλ. Εικόνα 2). Κατά την έξοδο του προς το κυτταρόπλασμα, η πρωτεΐνη σύνδεσης πολυ(A) (PABP) δεσμεύεται στην πολυ(A) ουρά και σταθεροποιεί το mRNA, διευκολύνοντας έτσι τη διαδικασία της μετάφρασης. Επιπλέον, η PABP συνδέεται με τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4G, ο οποίος με τη σειρά του συνδέεται με την πρωτεΐνη eIF4E3, ενισχύοντας έτσι τη μετάφραση του mRNA [9, 10]. Η

απουσία τόσο της πολυ(A) ουράς όσο και της PABP, μειώνει την ικανότητα του mRNA να μεταφράζεται [11]. Η πολυαδενυλίωση αποτελεί ένα απαραίτητο βήμα κατά επεξεργασία των mRNA του πυρήνα, το οποίο καταλύεται από το ένζυμο πολυ(A) πολυμεράση [12].



*Εικόνα 2. mRNA με 5'καλύπτρα και 3' πολυ(A) ουρά.*

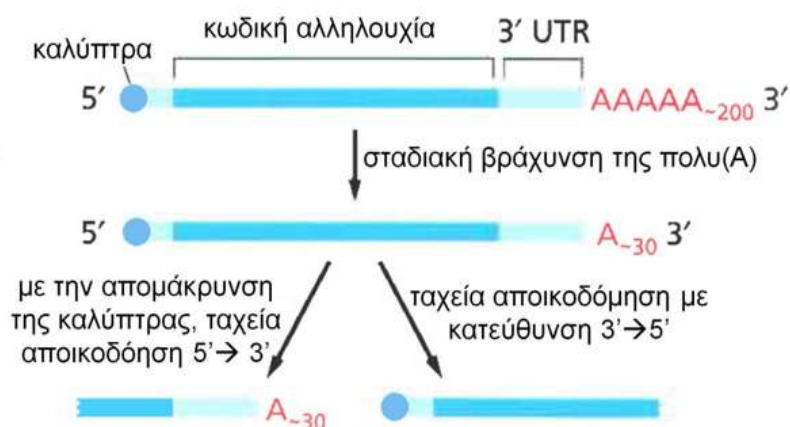
Ο χρόνος ζωής των ευκαρυωτικών mRNA είναι δυνατό να ποικίλλει από λεπτά έως και μήνες. Η ρύθμιση της σταθερότητας, της μετάφρασης και του εντοπισμού των mRNA, προσδιορίζουν το χρονοδιάγραμμα, την τοποθεσία στο κύτταρο και την ποσότητα της πρωτεΐνης που παράγεται κατά τη διάρκεια της μετάφρασης των mRNA [10].

### **1.2.1 Απαδενυλίωση**

Η πολυ(A) ουρά θεωρείται μια δυναμική δομή και οι μηχανισμοί που διαμορφώνουν τις ημερήσιες μεταβολές του μήκους της, τελικά καθορίζουν το χρονοδιάγραμμα της αποσύνθεσης και τη διάρκεια ζωής του μεταγράφου. Σε σύγκριση με την έναρξη της μεταγραφής, η αποσύνθεση των mRNAs είναι μια διαδικασία που συχνά παραβλέπεται, αλλά είναι υψηλά ρυθμιζόμενη και συμβάλλει σημαντικά στη συνολική διαμόρφωση της έκφρασης των κερκιδίων γονιδίων και του σήματος εξόδου των μηχανισμών του ρολογιού [8].

Η αποδόμηση των ευκαρυωτικών mRNA πραγματοποιείται μέσω δυο γενικών μηχανισμών. Το κοινό τους χαρακτηριστικό είναι η προοδευτική αποδόμηση της ουράς πολυ(A) από μια εξωνουκλεάση, που λαμβάνει χώρα όταν το mRNA εξέλθει από τον πυρήνα [9]. Η αποδόμηση της ουράς πέρα από ένα συγκεκριμένο σημείο επάγει την αποδόμηση και μεταφραστική σίγηση. Ως εκ τούτου, η απαδενυλίωση είναι μια καθοριστική διαδικασία που ρυθμίζει τους ρυθμούς μεταγραφής και μετάφρασης [10]. Όταν η ουρά πολυ(A) μειώνεται σε κρίσιμο μήκος, η διαδικασία αποικοδόμησης του mRNA μπορεί να ακολουθήσει δυο μονοπάτια. Το πρώτο, περιλαμβάνει την αφαίρεση της 5' καλύπτρας η οποία επάγει τη ταχεία αποδόμηση του εκτεθειμένου mRNA, από το 5' άκρο του. Στο δεύτερο μονοπάτι, η αποδόμηση του mRNA συνεχίζεται από το 3' άκρο μετά την αφαίρεση της πολυ(A) ουράς και ξεκινά η

αποδόμηση της κωδικής αλληλουχίας (βλ. Εικόνα 3). Η αποικοδόμηση των περισσότερων mRNA γίνεται και με τους δυο μηχανισμούς [9].



**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 [9].

Η διάρκεια του κύκλου ζωής των RNA είναι σημαντική ώστε να διατηρούνται σταθερά τα επίπεδα τους και ο ρυθμός με τον οποίο τα κύτταρα αναστέλλουν την έκφραση γονιδίων, των οποίων τα προϊόντα δεν είναι χρήσιμα πλέον για το κύτταρο [13]. Ο προστατευτικός ρόλος της πολυ(A) ουράς κατά τη μετάφραση συναντά ανταγωνισμό από εξειδικευμένες οδούς μεταφραστικής καταστολής και αποδόμησης των mRNA. Τα ένζυμα τα οποία πραγματοποιούν τη βράχυνση των πολυ(A) ουράς του mRNA, ονομάζονται απαδενυλάσες και είναι βασικοί παράγοντες στην διαδικασία μεταφραστικής καταστολής [10].

### 1.2.2 Απαδενυλάσες

Οι απαδενυλάσες είναι, εξαρτώμενες από το  $Mg^{2+}$ , εξωριβονουκλεάσες που υδρολύουν το RNA με κατεύθυνση 3' → 5', η οποία έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση 5'-AMP. Κύριο υπόστρωμα αυτών των ενζύμων είναι οι ουρές πολυ(A), αν και μερικές απαδενυλάσες μπορούν να αποδομούν και άλλα ριβοπολυμερή in vitro. Μόλις αφαιρεθεί η ουρά από ένα mRNA, προσελκύνονται άλλα ένζυμα αποικοδόμησης ώστε να ξεκινήσουν την αποσύνθεση του [10].

Με βάση τη σύγκριση των επικρατειών με δράση νουκλεάσης, οι απαδενυλάσες κατανέμονται στις οικογένειες DEDD και EEP (ενδονουκλεάσες- εξωνουκλεάσες- φωσφατάσες).

- **Οικογένεια DEDD**

Οι πρωτεΐνες αυτού του τύπου πήραν το όνομα τους από τα καλά συντηρημένα καταλυτικά κατάλοιπα Asp (D) και Glu (E) τα οποία εντοπίζονται διασκορπισμένα ανάμεσα σε 3 ξεχωριστά μοτίβα εξωνουκλεάσης, που συντονίζουν τα ιόντα Mg<sup>2+</sup>. Στην ομάδα αυτή ανήκουν και οι οικογένειες PAN2, POP2, PARN, CAF1Z.

- **Οικογένεια EEP**

Σε αυτή την οικογένεια οι πρωτεΐνες διαθέτουν στις επικράτειες νουκλεάσης τους, συντηρημένα καταλυτικά κατάλοιπα Asp και His. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν και οι απαδενυλάσες CCR4, ANGEL και 2' φωσφοδιεστεράση (2'PDE).

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

**Πίνακας 2. Η ποικιλομορφία των απαδενυλασών.** 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.laervis*, Mm: *M. musculus*, Hs: *H.sapiens* [10].

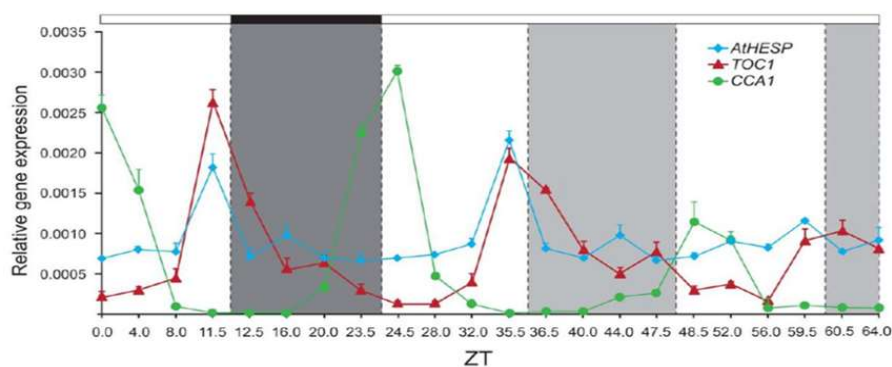
Μέσω απαδενυλίωσης απομακρύνονται επίσης και οι ουρές πολυ(A) που προστίθενται σε πολλά πυρηνικά, μη κωδικά RNA. Σε αυτόν τον τύπο απαδενυλίωσης εμπλέκεται δυναμικά το εξώσωμα του πυρήνα, πιθανότατα μέσω μιας εξωνουκλεάσης τύπου DEDD [10].

### 1.3 Η Hesperin

Όσον αφορά τη σχέση σταθερότητας-αποικοδόμησης των γονιδίων που σχετίζονται με το κερκάδιο ρολόι, μελέτες στο ήπαρ ποντικών έδειξαν ότι η έκφραση ενός μικρού συνόλου ελεγχόμενων γονιδίων παρέμεινε ρυθμική μετά την απενεργοποίηση του τοπικού ρολογιού και μεταξύ αυτών αρκετοί κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στον μετα-μεταγραφικό έλεγχο, όπως η Nocturnin. Η συγκέντρωση της Nocturnin παρουσιάζει το μέγιστο κατά τη

διάρκεια της νύχτας και ελέγχει το μήκος των ουρών πολυ(A), επηρεάζοντας έτσι τη σταθερότητα και τη δυνατότητα μετάφρασης των mRNA-στόχων, ακόμα και αν δεν αποτελεί του μηχανισμού του κεντρικού ταλαντωτή [8].

Ένα ομόλογο γονίδιο της *Nocturnin*, που παρά το γεγονός ότι ακολουθεί ένα ευδιάκριτο μοτίβο κερκιάδας έκφρασης δεν αποτελεί μέρος του κεντρικού ταλαντωτή είναι η HESPERIN ή AtHESP, από το φυτό *Arabidopsis thaliana*. Η AtHESP είναι μια 3'-εξωριβονουκλεάση με δράση απαδενυλάσης και επηρεάζει την έκφραση και τη ρυθμικότητα των γονιδίων του κεντρικού ταλαντωτή, *TOC1* και *CCA1*. Η πρωτεΐνη παρουσιάζει μέγιστα επίπεδα έκφρασης το απόγευμα (βλ. Εικόνα 4), και λόγω του προτύπου έκφρασής της πήρε το όνομά της από τον Έσπερο, το πρώτο άστρο που εμφανίζεται στον ουρανό πριν τη νύχτα [2].



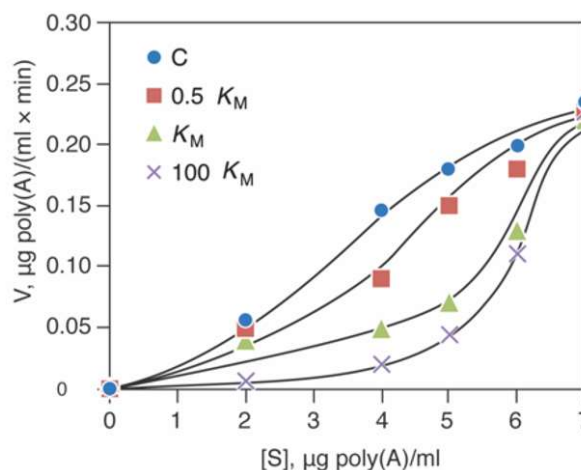
**Εικόνα 4.** Η ημερονύκτια χρονική εξέλιξη της έκφρασης της *AtHesp*, του *TOC1* και του *CCA1* σε φυτά *Arabidopsis thaliana* που αναπτύχθηκαν σε κύκλο 12h φως/12h σκοτάδι. Το γκρι χρώμα δείχνει τις περιόδους σκοταδιού. Η σχετική γονιδιακή έκφραση μετρήθηκε ανάλογα με το εσωτερικό γονιδιακό μετάγραφο του γονιδίου της ουβικιτίνης, το οποίο εμφανίζει ιδιόσυστατη έκφραση. Οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν στο μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων [2].

Έχει δειχθεί ότι πρόκειται για ένα ολιγομερές ένζυμο, πιθανότατα αποτελούμενο από πανομοιότυπες υπομονάδες. Μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης φαίνεται ότι η AtHESPERIN έχει μια καλά συντηρημένη περιοχή EEP, παρουσιάζοντας υψηλή ομοιότητα αλληλουχίας με άλλες απαδενυλάσες EEP, όπως *Nocturnin* και *CNOT6L* και έχουν επισημανθεί ορισμένα πιθανά καταλυτικά αμινοξέα [2]. Η ταυτοποίηση της AtHESP έγινε μέσω του αλγόριθμου TBLASTN, τη βάσης δεδομένων TAIR (βλ. Εικόνα 5).

	★	★	★	★	●	■	●	☆
HESP (At1G31500)	FESVEGVDIG	SRNKS DGFFA	IPLYLSKLVV (068)	ADFFLLQEV D (145)	GDFNSIFGDW (216)	--TLDYIFIS (371)	HHPSDHLPI	
HsNOC	ELLEECRA-V	LHTRPPRFQR	DFVDLRTDCP (138)	PDILLCLQEV D (197)	GDFNAEPT EE (321)	RHTLDYIWYS (382)	NYPSDHLSE	
MmNOC	ELLEECRA-V	LHTRPPRYQR	DFVDLRTDCS (135)	PDILLCLQEV D (195)	GDFNAEPT EE (306)	RHTLDYIWYS (380)	HYPSDHLSE	
RnNOC	ELLEECRA-V	LHTRPPRYQR	DFVDLRTDCS (134)	PDILLCLQEV D (194)	GDFNAEPT EE (229)	RHTLDYIWYS (379)	HYPSDHLSE	
XINOC	ELLEDCCV-V	LQDRPARLHR	DFFLRSSESS (093)	PDVLLCLQEV D (154)	GDFNADPT EE (289)	CHTLDYIWYS (339)	NYPSDHLSE	
HsCNOT6L (NP_853172)	ELGRLFQLQT	LGLKGNPLSQ	DILNLYQEPD (149)	ADIVSLQEV E (242)	ADLNSLPDSG (418)	--VIDYIFYS (494)	HIPSDHFSL	
HsCNOT6 (NP_056270)	ELGKLFQLQT	LGLKGNPLTQ	DILNLYQEPD (144)	ADIVSLQEV E (242)	ADLNSLPDSG (426)	--IDYIFYFS (496)	LIPSDHFSL	
Pt (XP_002304397.1)	FISVEGDDIY	SRSKPDG---	----- (029)	TDFFLLQELD (085)	GDFNSIFGDK (254)	--TLDYIFFS (310)	YHPSDHLPI	
RcNGL1 FIPVQAPHVF	SSTKPDG---	----- (10)	----- (029)	ADFLCLQEV D (159)	GDFNSIFGDK (241)	--TLDYIFFS (397)	YHPSDHLPI	
HsCCR4 (AF183961)	ELLEECRA-V	LHTRPPRFQR	DFVDLRTDCP (137)	PDILLCLQEV D (197)	GDFNAEPT EE (321)	RHTLDYIWYS (382)	NYPSDHLSE	
ScCCR4	EFGNLCNLQF	LGVEGNPLEK	QFLKILTEKS (450)	SDLLCLQEV E (558)	GDFNSYINS <sup>A</sup> (721)	--VIDYIWFSS (785)	KFPSDHLPL	

**Εικόνα 5.** 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 PDILLCLQEV για πρόσδεση Mg<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup>, το οποίο περιλαμβάνει και τα καταλυτικά αμινοξέα E193 της *MmNoc* ή το E556 της *ScCCR4* (και τα δυο καταδεικνύονται με μαύρο πολύγωνο). 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 [2].

Επιπλέον, σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και αφορούσαν στην μελέτη της σχέσης του ενζύμου με το θεωρητικό προϊόν της αντίδρασης της απαδενυλίωσης, δηλαδή του 5'AMP, παρατηρήθηκε ότι το AMP συμπεριφέρεται ως συναγωνιστικός αναστολέας. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει μια σχέση αρνητικής ανατροφοδότησης, το οποίο είναι ένα συχνό φαινόμενο που συμβάλει στη διατήρηση της ομοιόστασης, κατά τη διάρκεια μεταβολικών αντιδράσεων. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις υποστρώματος, παρατηρείται άρση της αναστολής από το AMP, καθώς οι τιμές τείνουν να πλησιάζουν τη V<sub>max</sub> του ενζύμου. Όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα κινητικής, η *AtHesp*, τείνει να παρουσιάζει αλλοστερική συμπεριφορά σχηματίζοντας τη χαρακτηριστική σιγμοειδή καμπύλη των αλλοστερικών ενζύμων [14](βλ. εικόνα 6).



**Εικόνα 6.** Αντιδράσεις απαδενυλίωσης με υπόστρωμα πολύ(A), οι οποίες πραγματοποιήθηκαν απουσία και παρουσία AMP (0.5, 1 και 100 KM).

## **2 ΣΚΟΠΟΣ**

Σκοπός της εργασίας είναι η βελτιστοποίηση των συνθηκών απομόνωσης της AtHESP, ο προσδιορισμός του ενεργού κέντρου του ενζύμου για την κατανόηση του μηχανισμού κατάλυσης.

Η βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου απομόνωσης θα οδηγήσει στην παραγωγή της πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα και την αύξηση της καθαρότητας (>90%), ώστε να επιχειρηθεί η διερεύνηση της δομής του ενζύμου. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε ένας νέος φορέας έκφρασης που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο, ο pATHRA, διάφορα στελέχη *E.coli* για την υπερέκφραση του γονιδίου, ενώ κατά την απομόνωση της AtHESP εξετάσθηκαν διάφορες συνθήκες pH, ρυθμιστικών διαλυμάτων.

Επιπλέον, για την κατανόηση του μηχανισμού κατάλυσης της AtHESP, πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες παρουσία διάφορων παραγόντων. Παράλληλα, με στόχο τη διερεύνηση του ενεργού κέντρου και του καταλυτικού μηχανισμού της πρωτεΐνης προς μελέτη, πραγματοποιήθηκε απομόνωση και μελέτη της ενζυμικής δραστητικότητας τεσσάρων μεταλλαγμάτων της AtHESP. Τα μεταλλάγματα αυτά δημιουργήθηκαν σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μέσω της στοχευμένης μετάλλαξης συγκεκριμένων καταλοίπων του ενζύμου, τα οποία είναι πιθανόν να έχουν άμεσο ρόλο στην κατάλυση, βάσει ομολογίας με ήδη χαρακτηρισμένες ορθόλογες απαδενυλάσες. Οι πρωτεΐνες στις οποίες δημιουργήθηκε μετάλλαξη, απομονώθηκαν με τον ίδιο τρόπο όπως και η AtHESP φυσικού τύπου και ακολούθησαν κινητικές μελέτες με σκοπό την εξέταση της ενζυμικής δραστητικότητας, ώστε να διαπιστωθεί ο χαρακτηρισμός των αμινοξέων αυτών ως καταλυτικών ή όχι.

## 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
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
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 <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O)	Panreac
Methanol	Applichem
Methylene Blue Solution	Merck
Methyl-β-D-thiogalactoside	SIGMA
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 <sub>3</sub> )	Panreac
Sodium Bicarbonate (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck
Sodium Carbonate Anhydrous (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Panreac
Sodium Chloride (NaCl)	Applichem
Sodium diHydrogen Phosphate	Merck
Sodium Hydrogen Phosphate	Merck
Sodium Hydroxide (NaOH)	Merck
Sodium Thiosulfate pentahydrate (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	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 κλωνοποίηση και υπερέκφραση πλασμιδίου

XL1-Blue	Agilent Technologies
----------	----------------------

#### 3.1.2.1 Βακτηριακά στελέχη για υπερέκφραση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης

BL21- Gold (DE3)	Agilent Technologies
Rosetta 2	Novagen

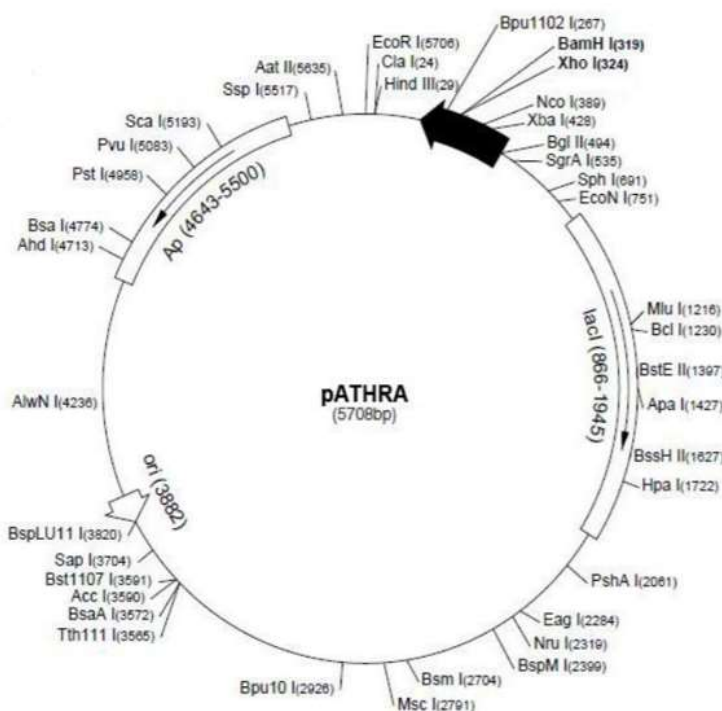
Η έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε από τα παραπάνω στελέχη της *E.coli*. Από το στέλεχος BL21- Gold απουσιάζουν οι πρωτεάσες *Lon* και *OmpT*, γεγονός που προάγει την σταθερότητα των πρωτεϊνών [15]. Το στέλεχος Rosetta 2 προέρχεται από το στέλεχος BL21 και περιλαμβάνει το πλασμίδιο 7 επιπλέον κωδικονίων *pRARE2*, ενισχύοντας έτσι την έκφραση ευκαρυωτικών πρωτεϊνών που περιέχουν κωδικόνια τα οποία χρησιμοποιούνται σπάνια από την *E. coli* [16].

### 3.1.3 Πλασμιδιακοί φορείς

pATHRA	Εργ. Δομικής & Λειτουργικής Βιοχημείας
--------	--

Τα πλασμίδια αποτελούν δίκλωνα και ως επί το πλείστον κυκλικά μόρια DNA, που δεν ανήκουν στο χρωμοσωμικό DNA και έχουν τη δυνατότητα να αντιγράφονται αυτόνομα σε συγκεκριμένους ξενιστές. Στη γενετική μηχανική λέγονται φορείς (*vectors*) και αποτελούν το μέσο για τον πολλαπλασιασμό ή την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Ο πλασμιδιακός φορέας, εκτός από το γονίδιο ενδιαφέροντος, εμπεριέχει και ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό. Το γονίδιο ενδιαφέροντος εισάγεται στην περιοχή του πολυσυνδέτη, που χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη αρκετών κοινώς χρησιμοποιούμενων θέσεων περιορισμού, γεγονός που επιτρέπει την εισαγωγή ενός τμήματος DNA ύστερα από πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες [17].

Ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή της πρωτεΐνης συζευγμένης με έξι ιστιδίνες (His-Tag) είναι ο pATHRA, ο οποίος διαθέτει παρόμοιες ιδιότητες με τον *pET15b* με τη διαφορά ότι η αλληλουχία αναγνώρισης για τη θρομβίνη έχει αντικατασταθεί από την αλληλουχία αναγνώρισης για την πρωτεάση 3C. Αυτό κρίθηκε απαραίτητο καθώς η θρομβίνη, λόγω της ικανότητας αναγνώρισης ενός μεγάλου εύρους υποστρωμάτων, παρουσιάζει χαμηλή εξειδίκευση. Αντίθετα, η πρωτεάση 3C εμφανίζει υψηλότερη εξειδίκευση και έχει καλά χαρακτηρισμένες συνθήκες αντίδρασης. Ο φορέας *pATHRA* είναι υλική και πνευματική ιδιοκτησία του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας [18]. (βλ. Εικόνα 6)



**Εικόνα 7.** Χάρτης πλασμιδιακού φορέα pATHRA. Ο pATHRA φέρει μια αμινοτελική αλληλουχία His-Tag®, που ακολουθείται από μια αλληλουχία αναγνώρισης για την πρωτεάση 3C και δύο θέσεις κλωνοποίησης.

### 3.1.4 Δείκτες Μοριακών Βαρών

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

### 3.1.5 Ένζυμα

Benzonase	SIGMA - Millipore
RNase inhibitor	Invitrogen

### 3.1.6 Υγρή Χρωματογραφία

Protino ® GST 4B Agarose	Macherey Nagel
HisTrap HP (Ni <sup>2+</sup> -Sepharose)	GE Healthcare
Minisart (0.45µm)	Sartorius stedim
Minisart (0.22µm)	Sartorius stedim
Tricorn Superpose 12 10/300 GL	GE Healthcare
Amicon Ultra 4 (10000 cutoff)	MERCK
Μεμβράνη διαπίδυσης (14000 cutoff)	Serva

### 3.1.7 Διαλύματα

#### 3.1.7.1 Ρυθμιστικά διαλύματα λύσης βακτηριακών κυττάρων με χρήση υπερήχων.

Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 1	Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 2	Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 3	Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 4
0.1M Tris (pH 8)	0.05M Na Citrate (pH 6)	0.1M HEPES (pH 8)	0.1M Phosphate Buffer (pH 8)
0.2M NaCl	0.2M NaCl	0.2M NaCl	0.2M NaCl
10% Glycerol	10% Glycerol	10% Glycerol	10% Glycerol
0.1% Monothioglycerol	0.1% Monothioglycerol	0.1% Monothioglycerol	0.1% Monothioglycerol
1mM PMSF	1mM PMSF	1mM PMSF	1mM PMSF
Ίχνη lysozyme	Ίχνη lysozyme	Ίχνη lysozyme	Ίχνη lysozyme
dH <sub>2</sub> O	dH <sub>2</sub> O	dH <sub>2</sub> O	dH <sub>2</sub> O

Για την απομόνωση της wt-AtHesp, από κύτταρα BL21-Gold και Rosetta 2, ανάλογα με την περίπτωση, δοκιμάστηκαν όλα τα ρυθμιστικά διαλύματα. Η απομόνωση των μεταλλαγμένων μορφών AtHesp, D287A και D346A έγινε με τη χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος λύσης 2, ενώ της μεταλλαγμένης μορφής H385A, έγινε με τη χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος 1. Η μονοθειογλυκερόλη, ο αναστολέας πρωτεασών σερίνης PMSF και η λυσοζύμη προστίθενται στο διάλυμα ακριβώς πριν από τη χρήση του. Η σερίνη και η ιστιδίνη αποτελούν στόχους πρωτεόλυσης. Ο PMSF δύναται να αναστείλει πρωτεάσες σερίνης, καθώς και ένζυμα με σερίνη στο ενεργό τους κέντρο [19].

#### 3.1.7.2 Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών

Ενδεικτικά: 6.8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 93.2mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 8)

#### 3.1.7.3 Ρυθμιστικά διαλύματα Υγρής Χρωματογραφίας

Πριν από τη χρήση όλων των κάτωθι διαλυμάτων, πραγματοποιήθηκε φιλτράρισμα με φίλτρο 0.45µm, απαέρωση με τη χρήση υπερήχων και φύλαξη στους 4°C.

➤ Χρωματογραφία Συγγένειας Ακίνητοποιημένου Μετάλλου

<i>Ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης 1</i>	<i>Ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης 2</i>	<i>Ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης 3</i>	<i>Ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης 4</i>
100mM Tris (pH 8)	50mM Na Citrate (pH 6)	100mM HEPES (pH 8)	100mM Phosphate Buffer (pH 8)
50mM Imidazole	50mM Imidazole	50mM Imidazole	50mM Imidazole
200mM NaCl	200mM NaCl	200mM NaCl	200mM NaCl
0.1% Monothioglycerol	0.1% Monothioglycerol	0.1% Monothioglycerol	0.1% Monothioglycerol

Για κάθε μια από τις παραπάνω περιπτώσεις παρασκευάστηκε και ένα ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης, πανομοιότυπο με το εκάστοτε διάλυμα εξισορρόπησης, με τη μόνη διαφορά την προσθήκη 700mM Imidazole.

➤ Χρωματογραφία Συγγένειας (Protino GST 4B)

<i>Ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης 1</i>
100mM Tris (pH 8)
200mM NaCl
0.1% Monothioglycerol

Σε κάθε μια από τις παραπάνω περιπτώσεις παρασκευάστηκε και ένα ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης, πανομοιότυπο με το εκάστοτε διάλυμα εξισορρόπησης, με τη μόνη διαφορά την προσθήκη 20mM ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH).

➤ Χρωματογραφία Μοριακής Διήθησης (Gel Filtration, Tricorn Superose 12)

100mM Na Citrate, 200mM NaCl, 0,1% MTG (pH 6.0)

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

250mM Tris, 1.92M Glycine. Δεν απαιτείται ρύθμιση του pH. Η παρασκευή Running Buffer 1×, για όγκο 1L γίνεται μέσω της αραιώσης 100mL Running buffer 10× σε 900mL dH<sub>2</sub>O. Τέλος, γίνεται προσθήκη SDS ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 0,1% [20].

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

240mM Tris-HCl (pH 6.8)
40% Glycerol
8% SDS
5% β-mercaptoethanol
0.04% Bromophenol Blue

Το διάλυμα αποθηκεύεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Το SDS αποτελεί τον βασικό αποδιατακτικό παράγοντα που αποδιατάσσει τη δευτεροταγή και την τριτοταγή δομή αποδίδει ανάλογα με τη μάζα κάθε πρωτεΐνης, ένα ενιαίο αρνητικό φορτίο. Η πλήρης αποδιάταξη της τριτοταγούς δομής γίνεται με θέρμανση τους  $95-98^{\circ}\text{C}$ . Η β-μερκαπτοαιθανόλη αποδιατάσσει την πρωτεΐνη και προκαλεί την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών, αναστέλλοντας έτσι την αναδίπλωση της πρωτεΐνης μετά το βρασμό. Αυτό επάγει την αποδιάταξη της τεταρτοταγούς δομής της πρωτεΐνης στις υπομονάδες της. Το κυανό της βρομοφαινόλης, παρουσιάζει ταχύτερη ηλεκτροφορητική κινητικότητα από τις ηλεκτροφορούμενες πρωτεΐνες και ρόλος του είναι να κάνεις εμφανές το μέτωπο της ηλεκτροφόρησης, [21].

### 3.1.7.6 Διαλύματα χρώσης πηκτών ακρυλαμιδίου

#### 3.1.7.6.1 Χρώση με Coomassie

10% Acetic Acid, Coomassie Blue 0.05% (40% Methanol, 10% Acetic Acid,  $\text{dH}_2\text{O}$ , Coomassie Blue R-250  $\sim 0.1\%$ ).

#### 3.1.7.6.2 Χρώση με Νιτρικό άργυρο ( $\text{AgNO}_3$ )

- **Fixation:** 50% Methanol, 5% Acetic Acid,  $\text{dH}_2\text{O}$ . Η παρουσία του οξέος, καθιστά τα μακρομόρια αδιάλυτα, αποτρέποντας έτσι τη διάχυση τους από την πηκτή κατά τα επόμενα στάδια της χρώσης. Επίσης, σε αυτό το βήμα, απομακρύνονται από την πηκτή ουσίες που θα μπορούσαν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα, όπως ρυθμιστικά διαλύματα, αποδιατακτικοί παράγοντες κ.λ.π..
- **Sensitization:** 0.02%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ . Το βήμα αυτό επιτρέπει στις πρωτεΐνες που είναι καθηλωμένες στην πηκτή να αντιδράσουν με τον άργυρο και επιταχύνει την επακόλουθη αναγωγή του ιόντος του αργύρου. Παράλληλα, το οξυανιόν του θείου ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) σχηματίζει ένα σύμπλοκο με τα ελεύθερα ιόντα του αργύρου εμποδίζοντάς το να αναχθεί σε μεταλλικό άργυρο. Η υπερβολική ευαισθητοποίηση της πηκτής έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του θορύβου, και για αυτό πραγματοποιούνται πλύσεις της πηκτής μεθειοθειικό νάτριο.
- **$\text{AgNO}_3$ :** 0.1%  $\text{AgNO}_3$ .

- Development: 2%, 0.04% Formaldehyde, dH<sub>2</sub>O. Η φορμαλδεΐδη, ανάγει τον άργυρο. Καθώς η αντίδραση λαμβάνει χώρα αποκλειστικά σε υψηλό pH, είναι αναγκαία η προσθήκη του Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, για τη μετατροπή του διαλύματος σε αλκαλικό.
- Stopping: 5% Acetic acid. Τέλος, η προσθήκη του οξικού οξέος, λόγω του όξινου χαρακτήρα, αποτρέπει την περαιτέρω οξείδωση του αργύρου.  
Όλα τα διαλύματα διατηρούνται σε θερμοκρασία +4°C. Τα διαλύματα για το *development* και το διάλυμα AgNO<sub>3</sub> φυλάσσονται στο σκοτάδι [22, 23].

### 3.1.7.7 Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 10×

1M Tris, 1M Boric acid, 50mM EDTA. Η διάλυση των συστατικών σε μορφή σκόνης πραγματοποιείται σε αποστειρωμένο μπουκάλι, χρησιμοποιώντας νερό ελεύθερο νουκλεασών (MilliQ-DEPC).

### 3.1.7.8 Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων RNA 2× (Sample buffer)

95% φορμαμίδιο, 5mM EDTA, 0,025% SDS, 0.025%. Το φορμαμίδιο εμποδίζει τη δράση των RNασών και συμβάλλει στη σταθερότητα των RNA [24]. Το EDTA προσδένει δισθενή ιόντα μετάλλων και ειδικά Mg<sup>2+</sup>, τα οποία είναι αναγκαία για τη ενεργότητα πολλών RNασών, με αποτέλεσμα να αναστέλλει τη δράση τους [25].

### 3.1.7.9 Διαλύματα για ανοσοαποτύπωση σε μεμβράνη PVDF

- Ponceau S: 0,1% Ponceau S w/v σε 1% οξικό οξύ. Χρησιμοποιείται για τη χρώση της μεμβράνης PVDF και την επιβεβαίωση της ηλεκτρομεταφοράς των πρωτεϊνών σε αυτή.
- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer buffer) 10×: 25mM Tris, 192mM Glycine, 1% SDS, 10% MetOH (προστίθεται στην τελική αραιώση).

### 3.1.7.10 Διαλύματα για την ανοσο-ανίχνευση πρωτεϊνών ακινητοποιημένων σε μεμβράνη PVDF

- Διάλυμα κορεσμού (Blocking Buffer): 5% Άπαχο γάλα σε σκόνη, 0,1 % Tween 20 σε PBS 1× (PBS 1×: NaCl 130mM, KCl 2mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5mM).
- PBS-T: 0,1% Tween 20 σε PBS 1×. Ρύθμιση pH στο 7,4 και αποστείρωση.
- Διάλυμα χημειοφωταύγειας (ECL): Lumisensor HRP substrate (Genscript),

Το σήμα ανιχνεύεται σε φιλμ ακτινογραφίας με τη βοήθεια των διαλυμάτων FIXER και DEVELOPER (Kodak).

### 3.1.7.11 Διαλύματα για τη μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της AtHesperin

- Νερό ελεύθερο νουκλεασών: MilliQ ddH<sub>2</sub>O 18.2 mΩ ή νερό για ενέσεις, 0.1% διαίθυλ-πυροανθρακικό εστέρα (DEPC), πριν από τη χρήση το διάλυμα αφήνεται όλη τη νύχτα ώστε να εξατμιστεί το DEPC και έπειτα αποστειρώνεται. Φυλάσσεται στο σκοτάδι. Το DEPC αναστέλλει τις RNάσες στο που βρίσκονται στο νερό [26].
- Διάλυμα αντίδρασης: 50mM Phosphate Buffer (ή Na Citrate), 2mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM NaCl, 0.5mM DTT, 10% glycerol (pH 6.5), η διθειοτρεϊτόλη αποτελεί αναγωγικό παράγοντα που επηρεάζει τη διαμόρφωση του ενζύμου κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων.
- Διάλυμα Κυανού του Μεθυλενίου 0.0012%: 0.01% κυανό του μεθυλενίου, 0.1M MOPS-KOH. Αποθηκεύεται στους 25°C, στο σκοτάδι.
- Διάλυμα Κυανού του Μεθυλενίου 0.006%: Αραίωση 1:2 του διαλύματος κυανού του μεθυλενίου 0,0012% προσθέτοντας απευθείας στην κυψελίδα φωτομέτρησης 0,5ml του διαλύματος 0,0012% και 0,5ml νερού ελεύθερου νουκλεασών.
- 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 στους 25°C, στο σκοτάδι.

### 3.1.8 Οργανολογία

Για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν όργανα τα οποία διατίθενται στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, καθώς και στους κοινόχρηστους χώρους του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας. Παρακάτω αναφέρονται τα σημαντικότερα εξ αυτών:

ÄKTA purifier (FPLC system)	GE Healthcare Life Sciences
Αυτόματες πιπέτες	Gilson, Nichiryo, Eppendorf
Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini PROTEAN® Tetra Cell	BioRad
Μεμβράνη PVDF διαμέτρου πόρων 0,20μm	Macherey-Nagel
Μετρητής pH	Metrohm
Σύστημα απεικόνισης	Protein Simple, Uvitech Cambridge
Φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους UV 1600-PC	VWR

## 3.2 Μέθοδοι

### 3.2.1 Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων επιδεκτικών προς χημικό μετασχηματισμό

Ο μετασχηματισμός ορίζεται ως η πρόσληψη και η ενσωμάτωση του εξωγενούς DNA από το περιβάλλον στο βακτηριακό γονιδίωμα. Ως επιδεκτικά κύτταρα ορίζονται τα βακτηριακά κύτταρα, τα οποία προσλαμβάνουν εξωγενές DNA. Η επώαση με  $\text{Ca}^{2+}$ , έχει πλασμολυτική επίδραση στην μεμβράνη της *E.coli*, επιτρέποντας έτσι σε μακρομόρια να τη διαπερνούν [27].

Αρχικά, λαμβάνεται κατάλληλη ποσότητα καλλιέργειας, η οποία έχει επωαστεί σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο, παρουσία αντιβιοτικού, κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 37°C (υπό συνεχή ανάδευση στις 210rpm), και χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό σε τελική συγκέντρωση 1/100, 200mL αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου το οποίο περιέχει κατάλληλο αντιβιοτικό. Ακολουθεί επώαση στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (210rpm) και φασματοφωτομετρική παρακολούθηση της ανάπτυξης εξετάζοντας ανά τακτά χρονικά διαστήματα 1mL καλλιέργειας, έως ότου η  $A_{600\text{nm}} = 0.5-0.7$  A, δηλαδή η καλλιέργεια βρίσκεται στο υψηλότερο επίπεδο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης. Έπειτα, φυγοκεντρείται όλη η καλλιέργεια με τη χρήση παγωμένων σωλήνων *falcon* (50mL), στις 4000rpm για 6min στους 4°C και εναποτίθενται σε πάγο. Μετά το πέρας 14min, γίνεται επαναδιάλυση του ιζήματος με παγωμένο διάλυμα 0.1M  $\text{CaCl}_2$  και τοποθέτηση στον πάγο για 20min. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 4000rpm για 6min, στους 4°C, επαναδιάλυση σε νέο παγωμένο διάλυμα 0.1M  $\text{CaCl}_2$  και τοποθέτηση στον πάγο για 12-16h. Τέλος, πραγματοποιείται αραίωση των



βακτηρίων σε γλυκερόλη (10% τελική συγκέντρωση), διαμοιρασμός σε κλάσματα των 100μL, σε σωλήνες τύπου *erppendorf* και αποθήκευση στους -80°C, αφού προηγηθεί ταχεία ψύξη (flash freeze) με τη χρήση παγωμένης αιθανόλης 100% (-80°C). Όλοι οι παραπάνω χειρισμοί εκτός από την επώαση, πραγματοποιούνται σε ψυχρό θάλαμο (+4°C) και πάγο, με υλικά και εργαλεία τα οποία έχουν αποστειρωθεί.

### **3.2.2 Μετασηματισμός επιδεκτικών βακτηρίων με τον επιθυμητό πλασμιδιακό φορέα**

Για το μετασηματισμό των βακτηριακών στελεχών *E.coli*, *BL21-Gold* (DE3), *Rosetta 2*, και *X11-Blue* (βλ.3.1.2) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του θερμικού σοκ (heat shock). Στα επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα, τα οποία είναι αποθηκευμένα σε σωληνάριο τύπου *erppendorf* γίνεται προσθήκη 50ng ανασυνδυασμένου πλασμιδίου (βλ. 3.1.3). Ακολουθεί ήπια ανάδευση και επώαση στους 0°C, για 30min και στη συνέχεια τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 42°C, για 45s ακριβώς. Έπειτα, επωάζονται στους 4°C, για 2min. Αφού ολοκληρωθούν τα 2 λεπτά, προστίθεται αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο, χωρίς αντιβιοτικό, σε τελικό όγκο 1ml. Αφού μετασηματιστούν, τα βακτηριακά κύτταρα επωάζονται στους 37°C υπό ανάδευση (180-210 rpm) για 1h. Στη συνέχεια, το 1/500 από τον αρχικό όγκο καλλιέργειας των μετασηματισμένων κυττάρων επιστρώνεται με γυάλινο διανομέα σε τρυβλία *petri* που διαθέτουν θρεπτικό μέσο *LB Agar* και κατάλληλο αντιβιοτικό. Ακολουθεί επώαση για 14-16h σε ξηρό θερμαινόμενο θάλαμο (37°C). Όλοι οι παραπάνω χειρισμοί, όπως η μεταχείριση των βακτηρίων και των αποστειρωμένων θρεπτικών μέσων, γίνονται υπό στείρες συνθήκες.

### **3.2.2 Υπερέκφραση του γονιδίου της *AtHESP* σε κύτταρα *BL21-Gold* (DE3) & *Rosetta 2***

Για την υπερέκφραση χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις αποστειρωμένες φλάσκες, των 2L, σε κάθε μία από τις οποίες τοποθετήθηκε υγρό θρεπτικό μέσο *LB Broth*, που να αντιστοιχεί περίπου στο 1/3 της χωρητικότητας της φλάσκας. Επίσης, σε κάθε φλάσκα προστέθηκαν από 50μg/mL του αντιβιοτικού αμπικιλίνη. Μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού, λήφθηκε 1mL θρεπτικού μέσου ώστε να χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας κατά τη φασματοφωτομετρική παρακολούθηση της πορείας της καλλιέργειας. Ακολούθησε εμβολιασμός των φλασκών, με όγκο 1/100 από μια υγρή καλλιέργεια των *BL21-Gold* και επώαση υπό ανάδευση, στους 37°C (180-210rpm), μέχρις ότου η οπτική απορρόφηση της οπτικής πυκνότητας να είναι  $A_{600nm}=0.7$ , που υποδηλώνει ότι η καλλιέργεια βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Στη συνέχεια προστέθηκε IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM, με σκοπό την επαγωγή της

υπερέκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Η υπερέκφραση πραγματοποιήθηκε για 4h, στους 37°C, υπό ανάδευση (180-210 rpm). Η παρουσία του IPTG στη βακτηριακή καλλιέργεια, επάγει την παράγωγή του RNA της πρωτεΐνης προς μελέτη. Αφού περάσουν 4h, οι φλάσκες τοποθετούνται στους 4 °C, για την επιβράδυνση της βακτηριακής ανάπτυξης. Ακολουθήσε φυγοκέντρηση για 30min, σε δοχεία συλλογής στις 4000rpm/4°C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, καθώς αποτελεί το θρεπτικό μέσο, και το κυτταρικό ίζημα φυλάχθηκε στους -80°C.

### **3.2.4 Λύση βακτηριακών κυττάρων**

Το κυτταρικό ίζημα που συλλέχθηκε μετά την υπερέκφραση, αποψύχθηκε σε πάγο και ακολούθησε επαναδιαλύση του ιζήματος σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης καθώς και σε μηχανική λύση με τη χρήση υπερήχων. Η λύση των κυττάρων επιτεύχθηκε μέσω 6 κύκλων των 40s, καθένας από τους οποίους περιλαμβάνει την παραγωγή υπερήχων εύρους 70%, σε συνεχόμενους κύκλους επί 20s, οι οποίοι διαπερνούν το κυτταρόλυμα και την ενδιάμεση παύση των υπερήχων για 20s. Λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της λύσης με υπερήχους, η διαδικασία πραγματοποιείται με παύσεις και ο σωλήνας του διαλύματος προς λύση τοποθετείται σε δοχείο με πάγο. Τέλος, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση του διαλύματος των λυμένων κυττάρων (21130 g/4°C/60 min).

### **3.2.5 Απομόνωση της AtHESP**

#### **3.2.5.1 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 μοιάζει με αυτή της απλής υγρής χρωματογραφίας συγγένειας, αλλά σε αυτή την περίπτωση το σύστημα διαθέτει μεγαλύτερο βαθμό αυτοματοποίησης, καθώς διαθέτει αντλίες θετικής μετατόπισης, οι οποίες επιτρέπουν τη ροή των διαλυμάτων μέσα στο σύστημα υπό υψηλή πίεση. Το υπερκείμενο που συλλέχθηκε μετά τις διαδικασίες λύσης και φυγοκέντρησης των βακτηριακών κυττάρων, φιλτραρίστηκε με τη χρήση φίλτρου διαμέτρου πόρων 0.45μm και το προκύπτον πρωτεϊνικό διάλυμα τοποθετήθηκε στο σωλήνα superloop. Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση είναι τα διαλύματα εξισορρόπησης-έκπλυσης και έκλουσης, τα οποία πριν από τη χρήση τους φιλτράρονται με φίλτρο 0.45μm υπό κενό και απαερώνονται με χρήση υπερήχων. Τα διαλύματα εξισορρόπησης-έκπλυσης και έκλουσης τοποθετούνται στις αντίστοιχες αντλίες του αναλυτή ÄKTApurifier (GE Healthcare). Η πορεία της χρωματογραφίας ελέγχεται από το υπολογιστικό πρόγραμμα Unicorn™.

#### **3.2.5.1.1 Απομόνωση της AtHESP με στήλη αγκιστείας Ni<sup>2+</sup> - σεφαρόζης**

Η χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC) στηρίζεται στις αλληλεπιδράσεις που σχηματίζονται μεταξύ ιόντων στοιχείων μετάπτωσης (Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>) που βρίσκονται ακινητοποιημένα πάνω σε ρητίνη, και συγκεκριμένων πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων [28]. Την πιο ισχυρή αλληλεπίδραση με τις ρητίνες αυτές παρουσιάζει η ιστιδίνη [28, 29], καθώς οι ομάδες δοτών ηλεκτρονίων στον υμιδαζολικό δακτύλιο της ιστιδίνης σχηματίζουν ημιπολικούς δεσμούς με το ακινητοποιημένο ιόν μετάλλου μετάπτωσης [28].

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιείται η στήλη Ni<sup>2+</sup>-σεφαρόζης (HisTrapHP) όγκου 1mL. Η εξισορρόπηση γίνεται με 15-20 όγκους στήλης (cv) από το κατάλληλο διάλυμα εξισορρόπησης ανάλογα την περίπτωση. Αφότου γίνουν οι κατάλληλες ρυθμίσεις για την πίεση και το ρυθμό ροής, το δείγμα εναποτίθεται στη στήλη, και ό,τι παρουσιάζει εξειδίκευση προς αυτή προσδένεται στα σφαιρίδια αφαρόζης, τα οποία διαθέτουν ακινητοποιημένα Ni<sup>2+</sup>, ενώ ό,τι δεν είναι ειδικό να απομακρύνεται στα διερχόμενα κλάσματα (flow-through). Η τεχνική αυτή στηρίζεται στην ικανότητα των ιόντων Ni<sup>2+</sup> να προσδένουν την σηματοδοτική ετικέτα έξι ιστιδινών, της πρωτεΐνης προς μελέτη. Κατά την έκλυση της στήλης, συλλέγονται κλάσματα τα οποία περιλαμβάνουν ό,τι δεν έχει αγκιστεία για τη στήλη. Έπειτα, ακολουθεί η έκλυση της πρωτεΐνης, η οποία πραγματοποιείται με βαθμίδωση συγκέντρωσης (0-100%) του διαλύματος έκλυσης. Όταν το διάλυμα έκλυσης φτάνει στο 100% της συγκέντρωσής του, γίνεται εξισορρόπηση από την αρχή, με διάλυμα εξισορρόπησης-έκπλυσης και η στήλη αποθηκεύεται σε 20% αιθανόλη.

#### **3.2.5.1.2 Αφαίρεση ετικέτας αγκιστείας από την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη AtHESP**

Για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών είναι απαραίτητες οι ετικέτες αγκιστείας (affinity tags), καθώς επιτρέπουν την ταυτοποίηση και την απομόνωση των πρωτεϊνών με τις οποίες είναι συντηγμένες [30]. Συχνά όμως, παρατηρείται ότι οι σηματοδοτικές ετικέτες μπορούν να επηρεάσουν τη βιολογική δράση των πρωτεϊνών, να εμποδίσουν την κρυστάλωσή τους, κ.α. [31]. Για το λόγο αυτό, συνήθως επιστρατεύονται ένζυμα (ενδοπρωτεάσες ή εξωπρωτεάσες), ώστε να αφαιρεθεί η ετικέτα αγκιστείας [30].

Η πρωτεάση 3C, που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την εργασία, είναι αυστηρά εξειδικευμένη ως προς την αλληλουχία αναγνώρισης LEVLFQ/GP. Μετά την πέψη της ετικέτας αγκιστείας ο παράγοντας εξειδίκευσής της πέψης, ο οποίος βρίσκεται την καρβοξυ- πλευρά του τμήσιμου δεσμού (/), παραμένει στην πρωτεΐνη-στόχο [31].

Στην παρούσα εργασία, η πρωτεάση 3C, συνδέεται με την πρωτεΐνη GST, με σκοπό να διευκολύνεται η απομάκρυνση της από το δείγμα, πραγματοποιώντας ένα ακόμα βήμα καθαρισμού. Για την πέψη της ετικέτας αγκιστείας μετά από το πρώτο στάδιο καθαρισμού

μέσω της στήλης αγχιστείας, πραγματοποιείται επώαση της πρωτεΐνης με την πρωτεάση 3C, με αναλογία 1mg πρωτεάσης 3C ανά 20mg πρωτεΐνης προς πέψη. Για να ολοκληρωθεί η πέψη πραγματοποιείται επώαση για 16h στους 4°C, υπό ήπια ανάδευση σε κυκλική κίνηση.

Ύστερα, το δείγμα εναποτίθεται στη στήλη αγχιστείας GST και πραγματοποιείται απομόνωση των κλασμάτων του υπερδιηθήματος, στα οποία είναι αναμένουμε την πρωτεΐνη προς μελέτη, αφού δεν αναμένεται να εμφανίζει συγγένεια προς τη στήλη. Στη συνέχεια, η πρωτεάση 3C με την ετικέτα αγχιστείας GST, εκλούεται σε διακριτά βήματα από τη στήλη, επιτρέποντας έτσι την απομόνωση της πρωτεΐνης απαλλαγμένης από την ετικέτα αγχιστεία ή την πρωτεάση.

### **3.2.5.1.3 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης**

Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης (Gel Filtration ή Size exclusion Chromatography, SEC) διαχωρίζει τα μόρια ανάλογα με τις διαφορές του μεγέθους τους [32]. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται πορώδη σφαιρικά σωματίδια, έτσι ώστε ο διαχωρισμός των μορίων να γίνεται με βάση το μέγεθος των πόρων, δηλαδή τα μικρά μόρια να διέρχονται διαμέσου των πόρων και να αργούν περισσότερο να εξέλθουν, σε σχέση με τα μεγαλύτερα που δεν μπορούν να διέλθουν από τους πόρους. Τα δείγματα εκλούνται ισοκρατικά, δηλαδή χωρίς την εφαρμογή βαθμίδωσης συγκέντρωσης ρυθμιστικού διαλύματος. [33].

Το γεγονός ότι τα μόρια δεν προσκολλώνται στο υλικό της στήλης χρωματογραφίας, υποδηλώνει ότι το ρυθμιστικό διάλυμα δεν επηρεάζει ιδιαίτερα το βαθμό διαχωρισμού μεταξύ των κορυφών και συνεπώς είναι πιο εύκολη η αλλαγή των συνθήκων ώστε να ακολουθούν τις ανάγκες της απομόνωσης του εκάστοτε δείγματος καθώς και άλλων διαδικασιών στις οποίες θα υποβληθεί (επιπλέον καθαρισμός, ανάλυση ή αποθήκευση), χωρίς να επηρεάζεται ο διαχωρισμός[32].

Η στήλη ξεπλένεται με έναν όγκο στήλης 0,5M NaOH σε χαμηλή ροή, ξεπλένεται με έναν όγκο στήλης ddH<sub>2</sub>O και στη συνέχεια εξισορροπείται με τουλάχιστον δυο όγκους στήλης με το ρυθμιστικό διάλυμα που θα χρησιμοποιηθεί για το δείγμα. Πριν την εφαρμογή του δείγματος, ο σωλήνας τύπου loop από όπου θα περάσει το δείγμα εκπλένεται με περίσσεια ddH<sub>2</sub>O, 20%EtOH, ddH<sub>2</sub>O και ρυθμιστικού διαλύματος. Τέλος, ακολουθεί η έκπλυση της στήλης με έναν όγκο στήλης 0,5M NaOH σε χαμηλή ροή και τουλάχιστον έναν όγκο στήλης ddH<sub>2</sub>O. Η στήλη αποθηκεύεται σε 20% EtOH.

## 3.2.6 Ηλεκτροφόρηση

### 3.2.6.1 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων

#### 3.2.6.1.1 Ηλεκτροφόρηση RNA

Η ηλεκτροφόρηση RNA σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου επιτρέπει την ανίχνευση, την ποσοτικοποίηση, το διαχωρισμό βάσει μεγέθους και την εκτίμηση της ποιότητας του RNA. Το RNA όντας αρνητικά φορτισμένο μόριο, μετακινείται προς την άνοδο κατά την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Το RNA μετακινείται αναλογικά με τη μάζα του, η οποία σχετίζεται κατά προσέγγιση με το μήκος της αλυσίδας RNA [34].

Η ηλεκτροφόρηση RNA σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου μπορεί να συμβεί υπό αποδιατακτικές ή μη συνθήκες. Η ηλεκτροφόρηση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες καθιστά εφικτό το διαχωρισμό διαφορετικών διαμορφώσεων και εναλλακτικά αναδιπλωμένων μορίων RNA, καθώς μπορεί και να εφαρμοστεί για το διαχωρισμό συμπλόκων RNA-πρωτεϊνών. Κατά την ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες είναι αναγκαία η προσθήκη ουρίας, καθώς δρα ως αποδιατακτικός παράγοντας καταργώντας τις ηλεκτροστατικές και άλλες ήπιες αλληλεπιδράσεις, αποδιατάσσοντας τις πιθανές δευτεροταγείς διαμορφώσεις της αλυσίδας του RNA [35].

**Πίνακας 3.** Σύσταση πηκτής διαχωρισμού.

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

### 3.2.6.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

#### 3.2.6.2.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών στοχεύει στο διαχωρισμό τους ανάλογα με το μοριακό τους βάρος και η πυκνότητα της πηκτής επιλέγεται με βάση την πρωτεΐνη προς μελέτη. Το συνήθως χρησιμοποιούμενο σύστημα ηλεκτροφόρησης είναι ασυνεχές, καθώς απαρτίζεται από 2 τμήματα διαφορετικής πυκνότητας την πηκτή επιστίβαξης, που έχει σταθερή πυκνότητα 5%, και την πηκτή διαχωρισμού, η πυκνότητα της οποίας μεταβάλλεται ανάλογα με το πείραμα. (βλ. Πίνακας 4). Ο σχηματισμός της πηκτής γίνεται μέσω της αντίδρασης πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου με το δις-ακρυλαμίδιο, η οποία λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία δωματίου και παρουσία υπερθειικού αμμωνίου (APS) και TEMED. Το TEMED

συμβάλει στην κατάλυση της αντίδρασης πολυμερισμού των ελεύθερων ριζών του θείου που δημιουργούνται από το APS. Η πηκτή επιστίβαξης προκαλεί τη στοίχιση των πρωτεϊνών σε μια κοινή ζώνη ώστε να ξεκινήσουν ταυτόχρονα τη μετακίνηση μέσα στην πηκτή διαχωρισμού, δημιουργώντας έτσι το μέτωπο της ηλεκτροφόρησης.

Η πηκτή κατασκευάζεται σε μια κάθετη διάταξη 2 τζαμιών τα οποία μεταξύ τους απέχουν 1mm και περιλαμβάνει θέσεις εναπόθεσης των δειγμάτων, οι οποίες σχηματίζονται από προσθήκη μιας ειδικής χτένας κατά τη διάρκεια πήξης της πηκτής επιστίβαξης. Αφού ολοκληρωθεί η πήξη, τοποθετείται μαζί με το καλούπι της, στην κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης, και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1× (Running Buffer 1×) (βλ.3.1.7) το οποίο πρέπει να είναι σε πλήρη επαφή με την πηκτή. Στα δείγματα προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων 4×, με σκοπό να επιτευχθεί ίση ποσότητα πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα και η τελική αραιώση των δειγμάτων να είναι 1×. Τα δείγματα, τοποθετούνται στους 95-98°C, για 5min, ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Ακολουθεί η εναπόθεση των δειγμάτων στα πηγάδια, καθώς και του μάρτυρα γνωστών μοριακών μεγεθών και η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέεται με το τροφοδοτικό (120V) [36].

Η κοινή πορεία όλων των μορίων κάθε δείγματος, από την κάθοδο προς την άνοδο, εξασφαλίζεται με την προσθήκη του αποδιατακτικού παράγοντα SDS, ο οποίος έχει την ικανότητα να καταργεί τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων φορτίζοντάς τα αρνητικά και προσδίδοντάς τους ένα σταθερό λόγο ανιονικού φορτίου προς μάζα, έτσι ώστε να μεταναστεύσουν όλα προς την άνοδο και ο διαχωρισμός να συμβεί βάσει του μοριακού τους βάρους και όχι του φορτίου [37].

**Πίνακας 4.** Σύσταση πηκτών διαχωρισμού και επιστίβαξης.

<b>Πηκτή διαχωρισμού</b>		<b>Πηκτή επιστίβαξης</b>	
	<b>10%</b>		<b>5%</b>
dH <sub>2</sub> O	1.9 mL	dH <sub>2</sub> O	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	3μL

### **3.2.7 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών από πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη PVDF**

Η διαδικασία ηλεκτρομεταφοράς των πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμιδίου στη μεμβράνη PVDF (ή νιτροκυτταρίνης) στηρίζεται στο γεγονός ότι τα σύμπλοκα πρωτεϊνών-SDS έχουν αρνητικό φορτίο και η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου θα ωθήσει τη μετακίνηση τους

προς την άνοδο με αποτέλεσμα να διαπεράσουν την πηκτική και να καθηλωθούν στη μεμβράνη, λόγω υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων. Πριν από τοποθέτηση της πηκτικής και της μεμβράνης στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς τα φύλλα Whatman, η πηκτική και η μεμβράνη τοποθετούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer). Η πηκτική τοποθετείται ανάμεσα από δύο ζεύγη τριών διηθητικών χαρτιών Whatman, με τη μεμβράνη προσανατολισμένη στο θετικό πόλο και την πηκτική στον αρνητικό. Στην περίπτωση της PVDF, προηγείται και ένα στάδιο εμβάπτισης της μεμβράνης σε 100% μεθανόλη, για 25-30 δευτερόλεπτα πριν τη μεταφορά στο Transfer Buffer. Η μεμβράνη και η πηκτική πρέπει να είναι άμεση επαφή, καθώς η παρεμβολή φυσαλίδων παρεμποδίζει τη διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος. Η μεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε υπό σταθερή ένταση ρεύματος 270mA, για 45 λεπτά. Η επιβεβαίωση της μεταφοράς γίνεται σε πρώτο στάδιο με παρατήρηση της μεταφοράς του μάρτυρα και στη συνέχεια με χρώση της μεμβράνης με Ponceau S.

### **3.2.8 Ανοσοανίχνευση**

Η τεχνική της ανοσοανίχνευσης επιτρέπει τον εντοπισμό των καθηλωμένων πρωτεϊνών σε μεμβράνη με τη χρήση αντισωμάτων. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην ικανότητα της πρωτεΐνης-αντιγόνου να αλληλοεπιδρά με ένα εξειδικευμένο ως προς αυτή αντίσωμα και έπειτα να είναι δυνατή η ανίχνευση του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος μέσω ενός δεύτερου αντισώματος, το οποίο εμφανίζει εξειδίκευση ως προς σταθερή περιοχή του πρώτου. Μετά από την ηλεκτρομεταφορά, η μεμβράνη PVDF επωάζεται σε διάλυμα κορεσμού (Blocking Buffer) για 1h, υπό ήπια ανάδευση, στους 25 °C, έτσι ώστε οι πρωτεΐνες του γάλακτος να καλύψουν τις μη ειδικές θέσεις σύνδεσης και να αποτραπούν οι μη ειδικές αλληλεπιδράσεις της μεμβράνης με το αντίσωμα. Ακολούθησε επώαση με το πρώτο αντίσωμα για 12-16 ώρες (overnight), στους 4°C, υπό συνεχή ανάδευση. Έπειτα η μεμβράνη εκπλένεται επανειλημμένα με διάλυμα PBS-T, για την απομάκρυνση της περίσσειας του πρώτου αντισώματος. Το πλήθος και η διάρκεια των επαναλαμβανόμενων πλύσεων εξαρτάται από το αντίσωμα. Ακολουθεί, επώαση της μεμβράνης με το δεύτερο αντίσωμα για μια ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.

Πριν από την εμφάνιση του σήματος επαναλαμβάνονται οι πλύσεις με PBS-T. Η ειδική πρόσδεση του πρώτου αντισώματος γίνεται αντιληπτή με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας. Ως χημειοφωταύγεια ορίζεται η εκπομπή φωτός που προέρχεται από την απελευθέρωση ενέργειας από ένα υπόστρωμα που βρίσκεται σε διεγερμένη κατάσταση και επηρεάζεται από μια χημική αντίδραση. Το συγκεκριμένο δευτερογενές αντίσωμα, είναι συντηγμένο με την υπεροξειδάση (HRP), ένα ένζυμο που παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) σε

αλκαλικό περιβάλλον, καταλύει την οξειδωση της λουμινόλης (luminol), εκπέμποντας ταυτόχρονα φωτόνια, που μπορούν να αποτυπωθούν σε ακτινογραφικό φιλμ με τη μορφή σκοτεινής ζώνης. Ενίσχυση της χημειοφωταύγειας μπορεί να επιτευχθεί όταν κατά την οξειδωση της λουμινόλης από την υπεροξειδάση (HRP) είναι παρόντες χημικοί ενισχυτές. Μετά την ολοκλήρωση των πλύσεων και της επώασης του δευτερογενούς αντισώματος η μεμβράνη εμβαπτίζεται στα αντιδραστήρια ανίχνευσης ενισχυμένης χημειοφωταύγειας, για 3 λεπτά, στο σκοτάδι (ECL). Η ανίχνευση επιτυγχάνεται μέσω της έκθεσης σε φιλμ αυτοραδιογραφίας. Η εμφάνιση μπορεί να διαρκέσει από 30 δευτερόλεπτα έως και 1 h, αναλογικά με την ένταση του σήματος, η οποία με τη σειρά της επηρεάζεται από την ποσότητα της πρωτεΐνης προς ανίχνευση.

### **3.2.9 Κινητικές μελέτες**

#### **3.2.9.1 Κινητικές μελέτες φασματοφωτομετρίας**

Η ενζυμική δραστηριότητα της AtHesp υπολογίστηκε σύμφωνα με τους Greiner-Stoeffele, T., et al. (1996) και Cheng, Y., et al (2006), με κάποιες παραλλαγές. Το κυανό του μεθυλενίου (3,7-δισ(Διμεθυλάμινο)-φαινοθειαζίν-5-χλωρίδιο, IUPAC) αποτελεί μια ετεροκυκλική ένωση τριών δακτυλίων που ανήκει στην κατηγορία των φαινοθειαζινών. Η AtHesp αποτελεί μια υδρολάση, καθώς διασπά δεσμούς με την συμμετοχή μορίων ύδατος και πιθανόν απελευθερώνει 5' μονοφωσφοεστέρες [2]. Στην αντίδραση της απαδενυλίωσης το κυανό του μεθυλενίου προσδένεται στο πολυμερές αδενοσινών, πολυ(A), το οποίο αποτελεί το υπόστρωμα της αντίδρασης και η ανάμιξη αυτή προκαλεί τη μετατόπιση του μεγίστου του φάσματος απορρόφησης από τα 653nm στα 662nm, αντί για τα 688nm [38]. Η ενζυμική υδρόλυση που συμβαίνει στο σύμπλοκο πολυ(A)-κυανού του μεθυλενίου έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της απορρόφησης, η οποία υποδηλώνει ότι μειώνεται η παρεμβολή του κυανού του μεθυλενίου στις βάσεις του υποστρώματος [39].

Αρχικά, προετοιμάστηκαν ανάλογα με τον αριθμό των αντιδράσεων, σωλήνες τύπου *eppendorf* στους οποίους πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις των 100  $\mu$ L (βλ. Πίνακα 5). Έπειτα γίνεται η προσθήκη 900  $\mu$ L (0,0012%) κυανού του μεθυλενίου και τα δείγματα μεταφέρονται σε αποστειρωμένες κυψελίδες του 1mL. Ακολουθεί επώαση των κυψελίδων στο υδατόλουτρο για 15min, στους 25°C στο σκοτάδι. Σε αυτή τη φάση οι κυψελίδες δεν περιέχουν ένζυμο. Μετά την πάροδο των πρώτων 15 λεπτών προστίθεται στις αντιδράσεις η κατάλληλη συγκέντρωση ενζύμου, αναδεύεται ήπια και φωτομετρείται ( $t=0$ min). Η μέτρηση γίνεται σε φασματοφωτομόμετρο ορατού φωτός στα 662nm ξεκινώντας με τη φωτομέτρηση του τυφλού (αντίδραση χωρίς ένζυμο) και στη συνέχεια των υπόλοιπων αντιδράσεων. Οι χρόνοι στους οποίους σημειώνεται η ενζυμική δραστηριότητα της AtHesp είναι: 0, 5, 10, 30 min. Μετά



το πέρας των 30 min, υπολογίζονται οι διαφορές των απορροφήσεων μεταξύ των τυφλών για  $t = 0 \text{ min}$  και των αντιδράσεων που αντιστοιχούν στο τυφλό αυτό. Οι προκύπτουσες τιμές για κάθε αντίδραση αναλύονται για το σχηματισμό της χρονοκαμπύλης ενζυμικής δράσης, και με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης πολυ(A) υπολογίζονται οι τιμές  $K_M$  και  $V_{\max}$  και τα διαγράμματα ταχύτητας προς συγκέντρωση υποστρώματος, Lineweaver –Burk (διπλού αντιστρόφου). Η ανάλυση των δεδομένων για το σχηματισμό της σιγμοειδούς καμπύλης της ταχύτητας-υποστρώματος, που είναι σημείο κατατεθέν των αλλοστερικών ενζύμων με πάνω από ένα καταλυτικά κέντρα, έγινε με το λογισμικό GraFit 6.

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

**Πίνακας 5.** Η αντίδραση γίνεται για τουλάχιστον 8 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.

### 3.2.9.2 Κινητικές μελέτες φθορισμού

Η μέθοδος μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητας της AtHesp και των μεταλλαγμένων μορφών της έγινε σύμφωνα με τους Maryati, M., et al. (2013) με κάποιες παραλλαγές. Στην παρούσα τεχνική χρησιμοποιείται ένα 17μερές υπόστρωμα RNA (5'- CCU UUC CAA AAA AAA AA -3'), που φέρει στο 5' άκρο του τη φθορίζουσα χρωστική Cy3 ομοιοπολικά συνδεδεμένη. Όλες οι αντιδράσεις συνέβησαν στους 25°C και χρησιμοποιήθηκαν 4μM 5'Cy3-RNA και 0.8μM ενζύμου σε κάθε μια από αυτές. Η αντίδραση τερματίστηκε μετά την προσθήκη 2x ρυθμιστικού διαλύματος δειγμάτων RNA και θέρμανση στους 85°C για 3min. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 20%-Ουρίας 8M. 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), στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Λάρισα).

## 4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

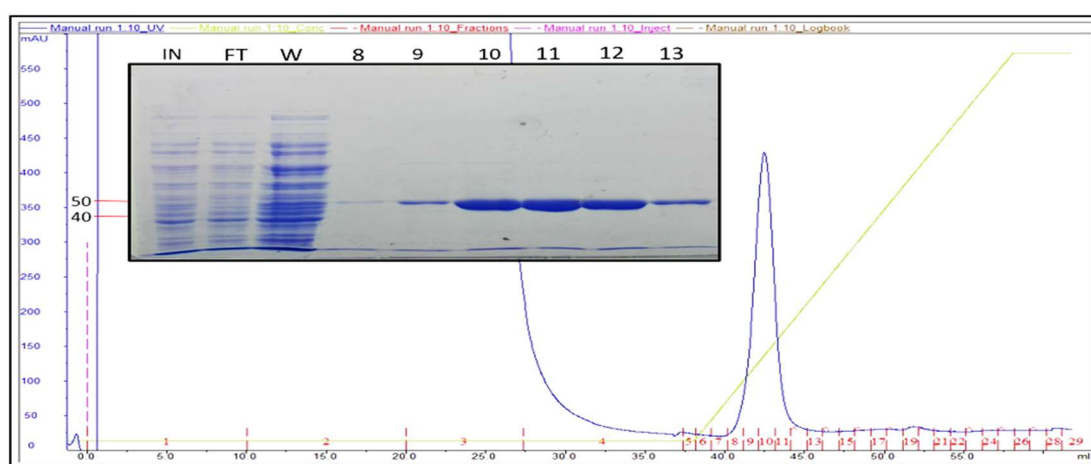
### 4.1 Βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου απομόνωσης της AtHESP

#### 4.1.1 Δοκιμασία διαφορετικών συνθηκών απομόνωσης της 6×His-AtHESP

Η wt-AtHESP απομονώθηκε με χρήση χρωματογραφίας αχιστείας ακινητοποιημένων μετάλλων μετά από υπερέκφραση από βακτήρια, όπως περιγράφηκε παραπάνω (βλ. 3.2.5.1 και 3.2.3). Η απομόνωση της AtHESP από το φορέα pATHRA, πραγματοποιήθηκε υπό διαφορετικές συνθήκες, χρησιμοποιώντας τα βακτηριακά στελέχη BL21-GOLD και τα Rosetta 2, καθώς και διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα και σε διαφορετικές τιμές pH (βλ. 3.1.7). Η έκλυση της πρωτεΐνης από τη στήλη νικελίου (HisTrap HP), έγινε με βαθμίδωση συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης κατά 5%. Με τη βοήθεια του λογισμικού Unicorn (Amersham) λήφθηκαν οι εικόνες των χρωματογραφήματων που ακολουθούν.

- **Απομόνωση από το βακτηριακό στέλεχος Rosetta 2**

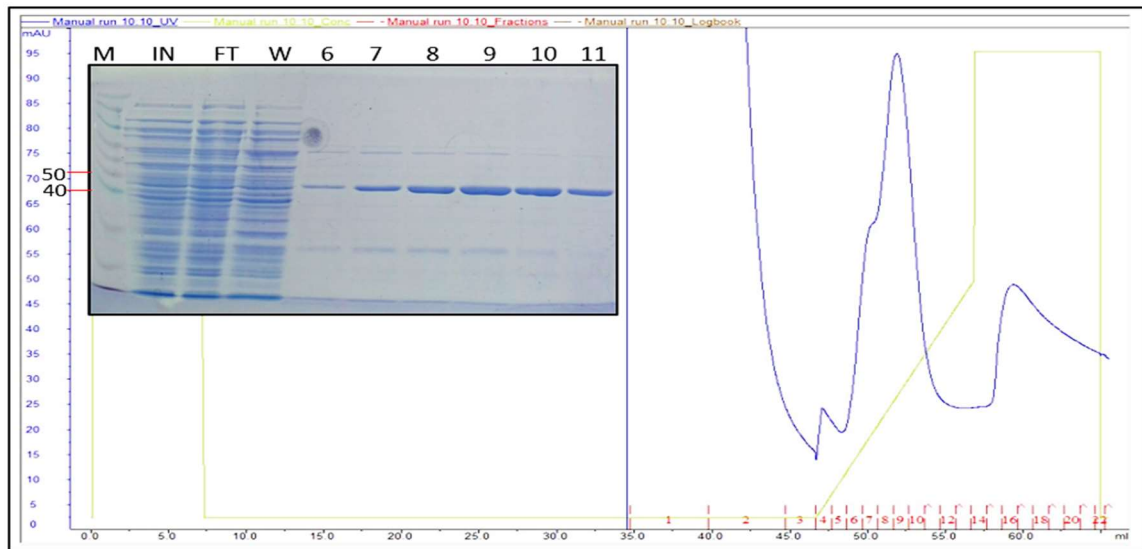
Η απομόνωση της AtHESP από το βακτηριακό στέλεχος Rosetta 2, πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M Tris-HCl, pH 8 (η ακριβής σύσταση των διαλυμάτων περιγράφεται στην παράγραφο 3.1.7). Στην εικόνα 8 φαίνεται το χρωματογράφημα και η πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Η απομονωμένη πρωτεΐνη φαίνεται αρκετά καθαρή και η απόδοση της απομόνωσης υπολογίστηκε σε 0,651mg πρωτεΐνης ανά λίτρο βακτηριακής καλλιέργειας. Η απομονωμένη πρωτεΐνη δεν ήταν σταθερή στο διάλυμα και έτσι δεν ακολούθησε επόμενο στάδιο καθαρισμού.



**Εικόνα 8.** Χρωματογράφημα από τη στήλη νικελίου (HisTrapHP, GE) της πρωτεΐνης AtHESP. Η πράσινη κάθετος καταδεικνύει την αρχή της έκλυσης της πρωτεΐνης. Ένθετο: Ανάλυση των εκλουσμένων πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 10%. IN: υπερκείμενο μετά τη λύση των κυττάρων, FT: υπερδιήθημα, Αριστερά υποδεικνύονται με κόκκινη γραμμή πληροφορίες του δείκτη μοριακών μαζών. Οι αριθμοί στις διαδρομές αντιστοιχούν στην αρίθμηση των κλασμάτων έκλυσης.

- **Απομόνωση από το βακτηριακό στέλεχος BL21-GOLD**

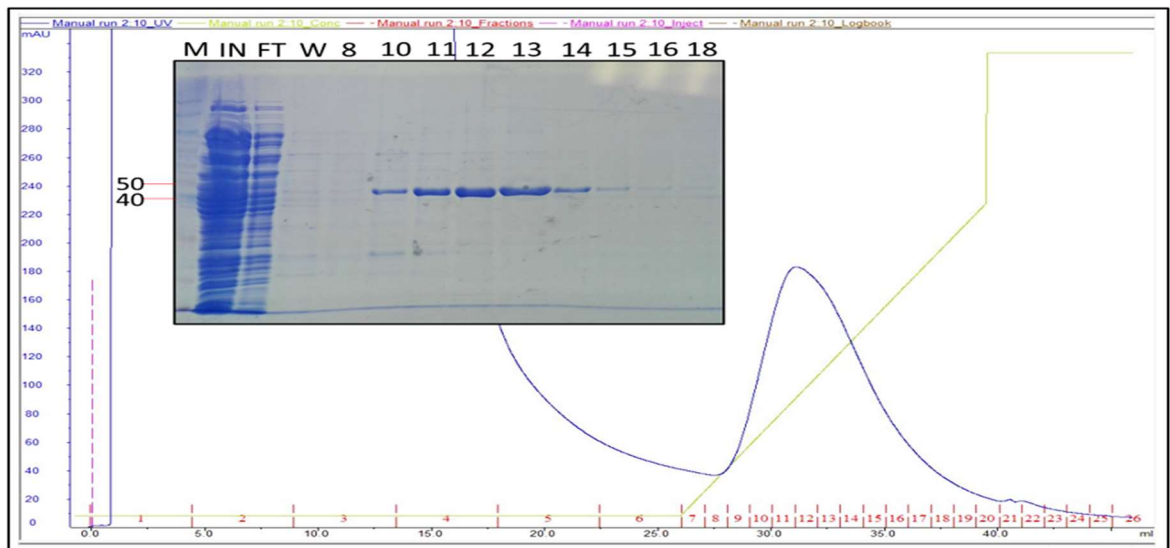
Πραγματοποιήθηκε προσπάθεια απομόνωσης από το βακτηριακό στέλεχος BL21-GOLD σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M HEPES, pH 8 (βλ. § 3.1.7). Στην εικόνα 9 φαίνεται το χρωματογράφημα και η πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Η απομονωμένη πρωτεΐνη φαίνεται αρκετά καθαρή και η απόδοση της απομόνωσης υπολογίστηκε σε 0,66mg πρωτεΐνης ανά λίτρο βακτηριακής καλλιέργειας. Παρόλα αυτά, η πρωτεΐνη δεν ήταν σταθερή στο διάλυμα οπότε δεν κατέστη δυνατός ο περαιτέρω καθαρισμός της.



**Εικόνα 9.** Χρωματογράφημα από τη στήλη νικελίου (HisTrapHP, GE) της πρωτεΐνης AtHESP. Η πράσινη κάθετος καταδεικνύει την αρχή της έκλουσης της πρωτεΐνης. Ένθετο: Ανάλυση των εκλουσμένων πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 10%. IN: υπερκείμενο μετά τη λύση των κυττάρων, FT: υπερδιήθημα, M: δείκτης μοριακών μαζών. Οι αριθμοί στις διαδρομές αντιστοιχούν στην αρίθμηση των κλασμάτων έκλουσης.

- **Απομόνωση από το βακτηριακό στέλεχος BL21-GOLD**

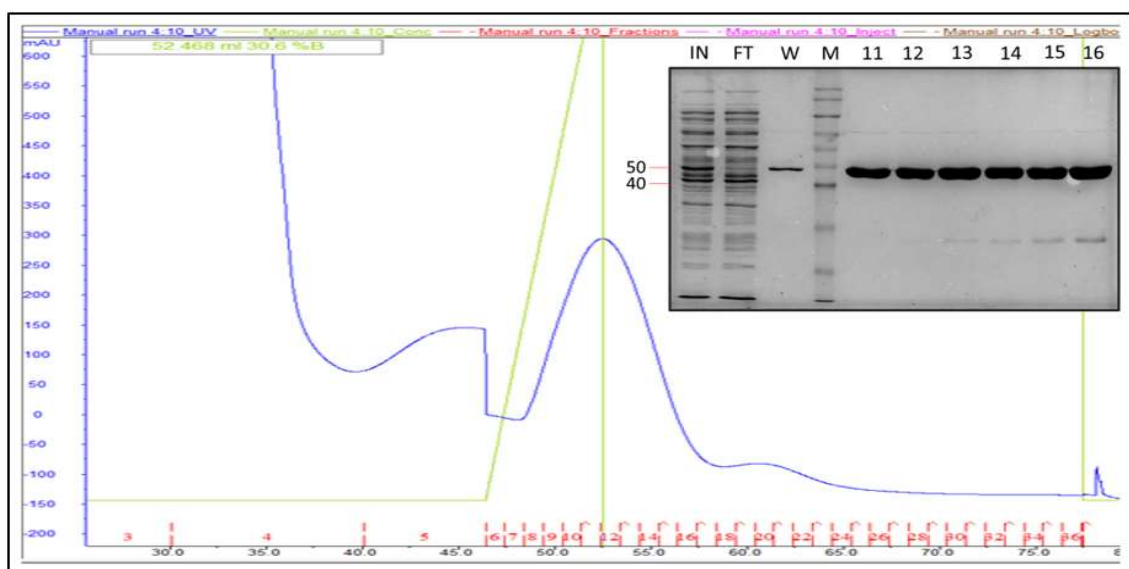
Πραγματοποιήθηκε προσπάθεια απομόνωσης από το βακτηριακό στέλεχος BL21-GOLD σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M Na-Citrate, pH 6 (βλ. § 3.1.7). Στην εικόνα 10 φαίνεται το χρωματογράφημα και η πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Η απομονωμένη πρωτεΐνη φαίνεται αρκετά καθαρή και η απόδοση της απομόνωσης υπολογίστηκε σε 0,367mg πρωτεΐνης ανά λίτρο βακτηριακής καλλιέργειας. Και σε αυτή την περίπτωση, η πρωτεΐνη δεν ήταν σταθερή στο διάλυμα οπότε δεν συνεχίστηκε περαιτέρω ο καθαρισμός της.



**Εικόνα 10.** Χρωματογράφημα από τη στήλη νικελίου (HisTrapHP, GE) της πρωτεΐνης AtHESP. Η πράσινη κάθετος καταδεικνύει την αρχή της έκλουσης της πρωτεΐνης. Ένθετο: Ανάλυση των εκλουσμένων πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 10%. IN: υπερκείμενο μετά τη λύση των κυττάρων, FT: υπερδιήθημα, M: δείκτης μοριακών μαζών. Οι αριθμοί στις διαδρομές αντιστοιχούν στην αρίθμηση των κλασμάτων έκλουσης.

- **Απομόνωση από το βακτηριακό στέλεχος BL21-GOLD**

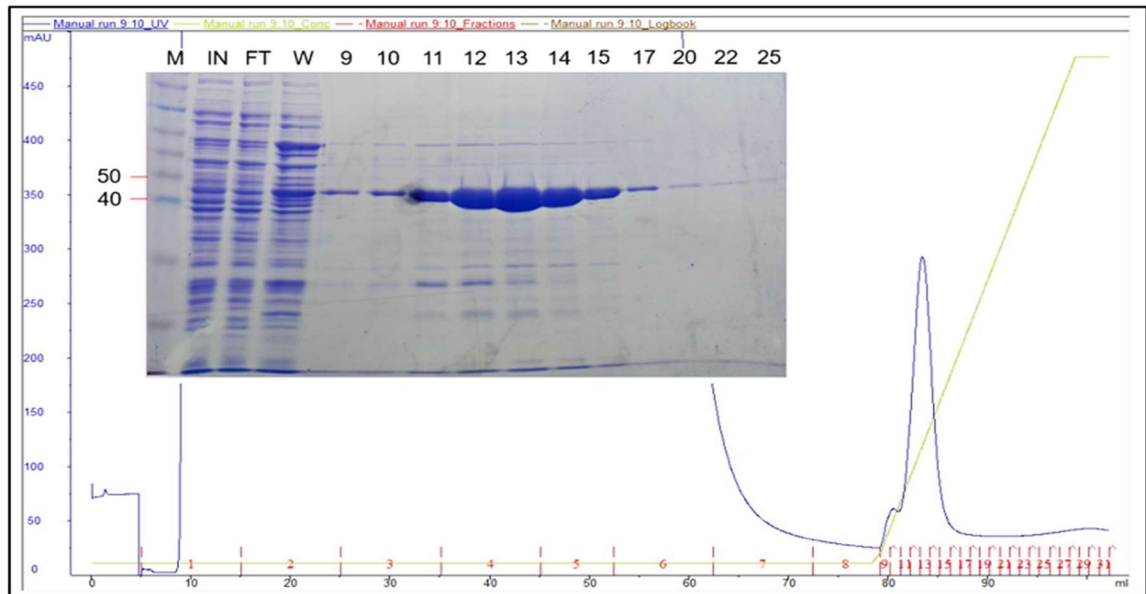
Πραγματοποιήθηκε προσπάθεια απομόνωσης από το βακτηριακό στέλεχος BL21-GOLD σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M Na-Phosphate, pH 8 (βλ. § 3.1.7). Στην εικόνα 11 φαίνεται το χρωματογράφημα και η πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Η απομονωμένη πρωτεΐνη φαίνεται αρκετά καθαρή και η απόδοση της απομόνωσης υπολογίστηκε σε 0,6mg πρωτεΐνης ανά λίτρο βακτηριακής καλλιέργειας. Και σε αυτή την περίπτωση, η πρωτεΐνη δεν ήταν σταθερή στο διάλυμα οπότε δεν κατέστη δυνατός ο περαιτέρω καθαρισμός της.



**Εικόνα 11.** Χρωματογράφημα από τη στήλη νικελίου (HisTrapHP, GE) της πρωτεΐνης AtHESP. Η πράσινη κάθετος καταδεικνύει την αρχή της έκλουσης της πρωτεΐνης. Ένθετο: Ανάλυση των εκλουσμένων πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 10%. IN: υπερκείμενο μετά τη λύση των κυττάρων, FT: υπερδιήθημα, M: δείκτης μοριακών μαζών. Οι αριθμοί στις διαδρομές αντιστοιχούν στην αρίθμηση των κλασμάτων έκλουσης.

- **Απομόνωση από το βακτηριακό στέλεχος BL21-GOLD**

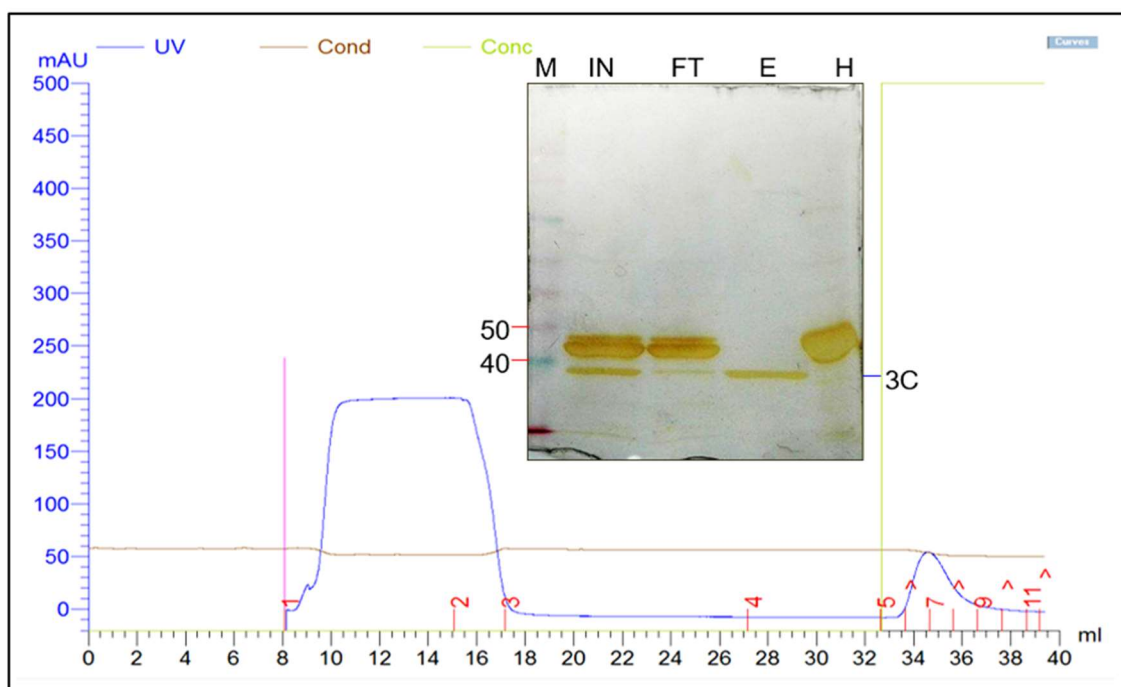
Πραγματοποιήθηκε προσπάθεια απομόνωσης από το βακτηριακό στέλεχος BL21-GOLD σε ρυθμιστικό διάλυμα 100mM Tris, pH8 (η ακριβής σύσταση των διαλυμάτων περιγράφεται στην παράγραφο 3.1.7). Στην εικόνα 12 φαίνεται το χρωματογράφημα και η πηκτική πολυακρυλαμίδης. Η πρωτεΐνη που απομονώθηκε ήταν καλής ποιότητας και αρκετή σε ποσότητα ώστε να συνεχίσουμε σε επόμενα βήματα.



**Εικόνα 12.** Χρωματογράφημα από τη στήλη νικελίου (HisTrapHP, GE) της πρωτεΐνης AtHESP. Η πράσινη κάθετος καταδεικνύει την αρχή της έκλουσης της πρωτεΐνης. Ένθετο: Ανάλυση των εκλουσμένων πρωτεϊνών σε πηκτική πολυακρυλαμίδιου. IN: υπερκείμενο μετά τη λύση των κυττάρων, FT: υπερδιήθημα, M: δείκτης μοριακών μαζών. Οι αριθμοί στις διαδρομές αντιστοιχούν στην αρίθμηση των κλασμάτων έκλουσης.

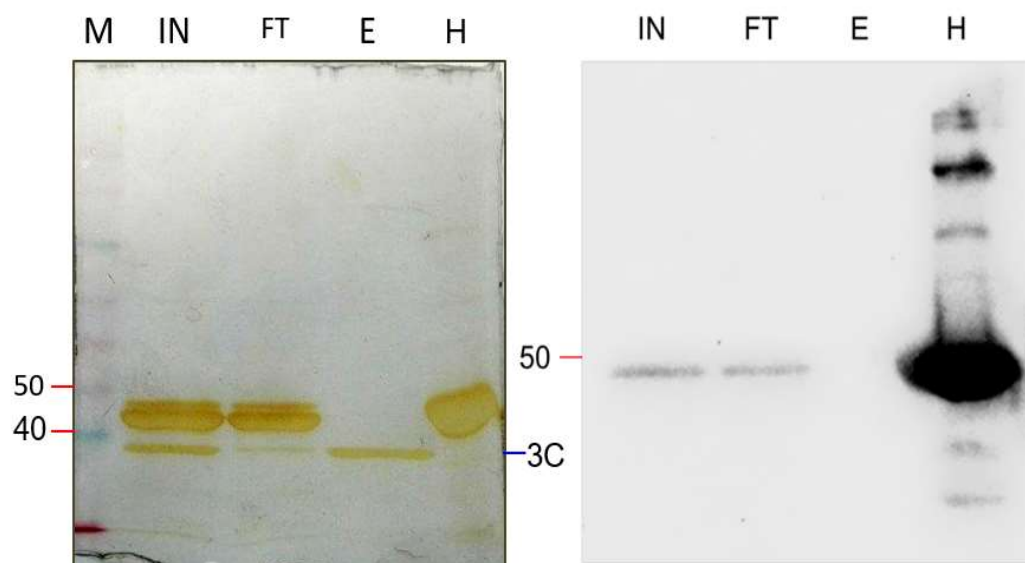
- **Απομάκρυνση της σηματοδοτικής ετικέτας (6×His-Tag)**

Τα κλάσματα που περιείχαν την πρωτεΐνη προς μελέτη (AtHESP), συλλέχθηκαν και επώαστηκαν με την πρωτεάση 3C, η οποία είναι ειδική για την τμήση της σηματοδοτικής ετικέτας όπως αναφέρθηκε παραπάνω (βλ. 3.2.5.2). Ο έλεγχος της επιτυχίας της πέψης της AtHESP καθώς και η απομάκρυνση της πρωτεάσης 3C, έγινε με ένα επιπλέον βήμα καθαρισμού. Το δείγμα μεταφέρθηκε στη στήλη αχιστείας GST και η πρωτεΐνη προς μελέτη συλλέχθηκε στα διερχόμενα κλάσματα (flow-through), καθώς δεν εμφάνιζε κάποια αχιστεία προς της στήλη. Στα κλάσματα έκλουσης παραλαμβάνεται η πρωτεάση 3C που φέρει σηματοδοτική ετικέτα GST και αλληλεπιδρά κανονικά με το υλικό της στήλης. Στην επόμενη Εικόνα φαίνεται το χρωματογράφημα, καθώς και η πηκτική πολυακρυλαμίδιου.



**Εικόνα 13. Χρωματογράφημα στήλης αγκιστείας GST 4B (Protino® GST 4B Agarose), αφαίρεση σηματοδοτικής ετικέτας (6xHis). Η κόκκινη κάθετος αντιπροσωπεύει την εισαγωγή δείγματος πρωτεϊνών στη στήλη. Ένθετο: Ανάλυση των εκλουσμένων πρωτεϊνών σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου Tris-glycine SDS-PAGE 8%, μετά από χρώση με AgNO<sub>3</sub>. IN: δείγμα πρωτεΐνης μετά την πέψη με την πρωτεάση 3C, FT: υπερδιήθημα, H: Hesperin με His-tag, ως μάρτυρας, M: δείκτης μοριακών μαζών. Οι αριθμοί στις διαδρομές αντιστοιχούν στην αρίθμηση των κλασμάτων έκλουσης**

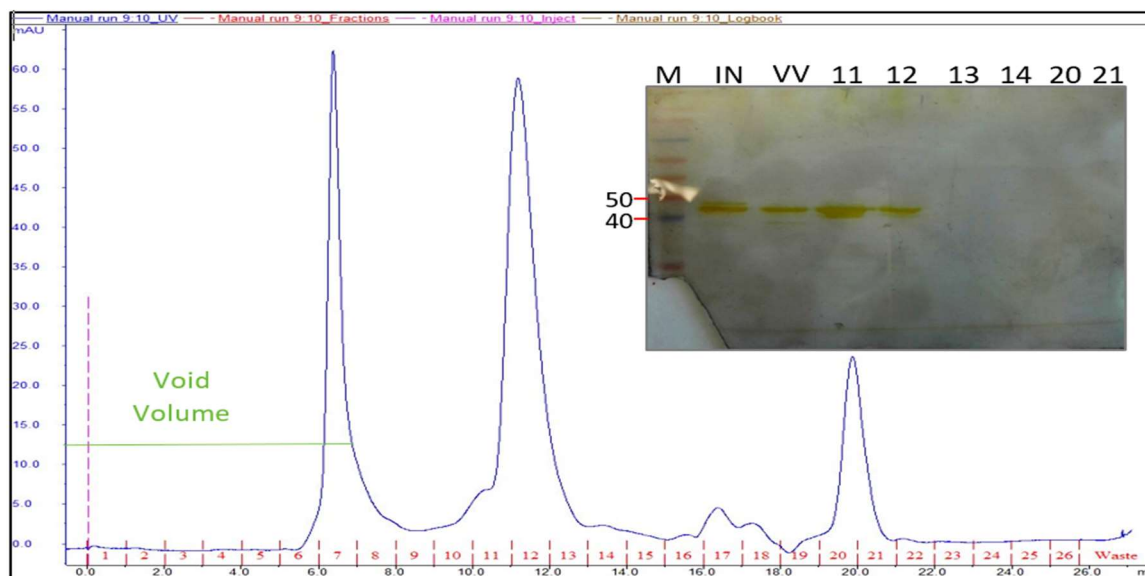
Στη συνέχεια, για την ταυτοποίηση και την καλύτερη οπτικοποίηση της εναπομείνουσας 6xHis-AtHESP πραγματοποιήθηκε ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτική πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη PVDF και ανοσοανίχνευση χρησιμοποιώντας ένα αντίσωμα που αναγνωρίζει τη σηματοδοτική ετικέτα 6xHis-Tag (βλ. 3.2.7).



**Εικόνα 14. Ανοσοανίχνευση της AtHESP που φέρει ετικέτα 6xHis. A) Πηκτική πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE 8%, μετά από στήλη GST και χρώση με AgNO<sub>3</sub>. B) Ακτινογραφικό φιλμ ανοσοανίχνευσης της 6xHis-AtHESP.**

- **Χρωματογραφία μοριακής διήθησης**

Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης έγινε με τη στήλη Tricorn Superose 12 10/300 GL, και είχε ως σκοπό τη βελτίωση της ποιότητας του δείγματος. Στο τέλος της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης, επιτεύχθηκε η απομάκρυνση της εναπομείνουσας 6×His-AtHESP από το δείγμα της πρωτεΐνης και τα κλάσματα που περιείχαν την AtHESP που δε φέρει ετικέτα 6×His συλλέχθηκαν και συμπυκνώθηκαν για επόμενες αναλύσεις. Η απόδοση της απομόνωσης υπολογίστηκε σε 0,63mg πρωτεΐνης ανά λίτρο βακτηριακής καλλιέργειας.



**Εικόνα 15.** Χρωματογράφημα στήλης μοριακής διήθησης. Ένθετο: 10% SDS-PAGE των κλασμάτων της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης. Κόκκινη διακεκομμένη: εισαγωγή δείγματος στη στήλη, πράσινη οριζόντιος: κενός όγκος στήλης, M: δείκτης μοριακών μαζών, IN: δείγμα πρωτεΐνης που συλλέχθηκε από τη στήλη GST 4B, Void Volume: κενός όγκος στήλης. Οι αριθμοί των διαδρομών αντιστοιχούν στα κλάσματα της ΆΚΤΑ.

- **Απόδοση**

Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η απόδοση της απομόνωσης της AtHESP, για κάθε μια από τις παραπάνω περιπτώσεις. Ως απόδοση ορίζεται η ποσότητα της καθαρής πρωτεΐνης στο τέλος των βημάτων της απομόνωσης σε κάθε περίπτωση, ανά λίτρο αρχικής καλλιέργειας.

**Πίνακας 6.** Απόδοση απομόνωσης AtHESP σε διαφορετικές συνθήκες.

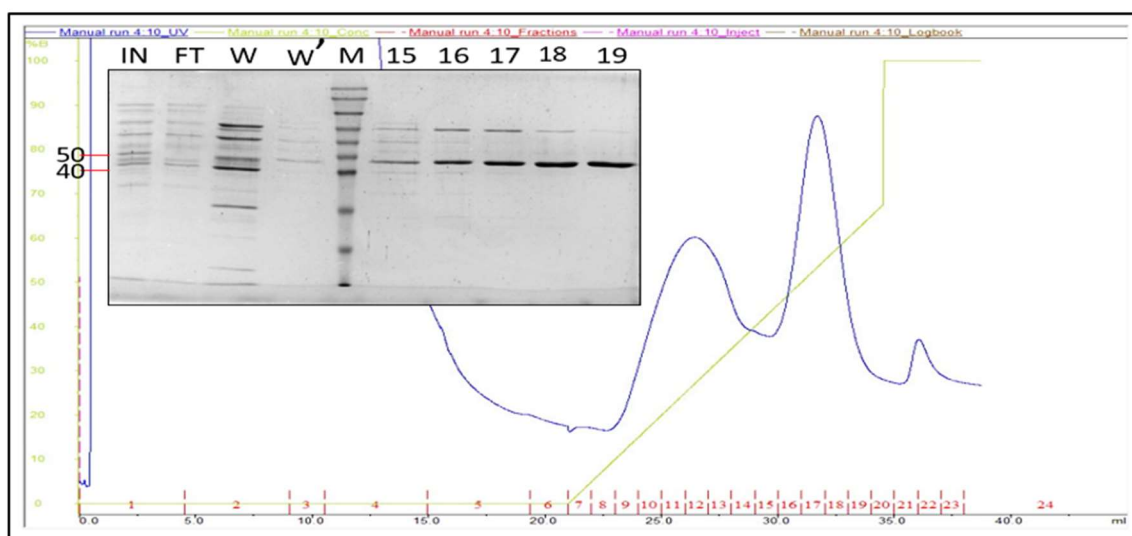
Ρυθμιστικό Διάλυμα	Βακτηριακό στέλεχος	Απόδοση (mg/L)
Tris-HCl, pH 8	Rosetta 2	0.651
HEPES, pH 8	BL21-GOLD	0.66
Na-Citrate, pH 6	BL21-GOLD	0.367
Na-Phosphate, pH 8	BL21-GOLD	0.6
Tris-HCl, pH 8	BL21-GOLD	0.635

#### 4.1.2 Απομόνωση των μεταλλαγμένων μορφών της AtHESP

Με στόχο τη διερεύνηση του ενεργού κέντρου και του καταλυτικού μηχανισμού της AtHESP, πραγματοποιήθηκε απομόνωση και μελέτη της ενζυμικής δραστηρότητάς 3 μεταλλαγμάτων της AtHESP (D287A, D346A, H385A). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την υπερέκφραση και την απομόνωση των μεταλλαγμάτων είναι παρόμοια με αυτή της φυσικού τύπου Hesperin (wt-HESP) και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται στις ενότητες 3.1.7 και 3.2.5.

Ομοίως με τη wt-HESP, η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία αχιστείας ακινητοποιημένου μετάλλου μετά από υπερέκφραση από βακτήρια, όπως περιγράφηκε παραπάνω (βλ. 3.2.5.1 και 3.2.3). Η έκλουση των πρωτεϊνών από τη στήλη νικελίου (HisTrap HP), πραγματοποιήθηκε με βαθμίδωση συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης (βλ. 3.1.7) κατά 5%, δηλαδή αύξηση της συγκέντρωσης του ιμιδαζολίου 5% ανά mL, δηλαδή κατά 35mM ιμιδαζολίου ανά mL. Με τη βοήθεια του λογισμικού Unicorn (Amersham) λήφθηκαν οι εικόνες των χρωματογραφήματων που ακολουθούν.

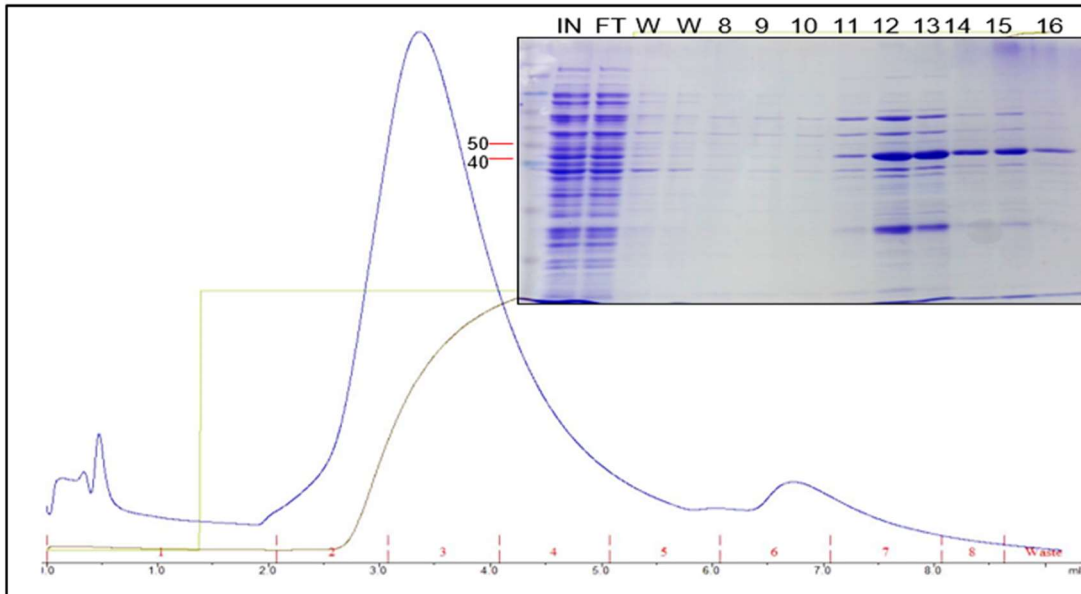
- **Απομόνωση της AtHESP-D287A**



**Εικόνα 16. Χρωματογράφημα από τη στήλη νικελίου (HisTrapHP, GE) της πρωτεΐνης AtHESP-D287A.** Η πράσινη κάθετος καταδεικνύει την αρχή της έκλουσης της πρωτεΐνης. Ένθετο: Ανάλυση των εκλουσμένων πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 10%. IN: υπερεκίμενο μετά τη λύση των κυττάρων, FT: υπερδιήθημα, M: δείκτης μοριακών μαζών. Οι αριθμοί στις διαδρομές αντιστοιχούν στην αρίθμηση των κλασμάτων έκλουσης.

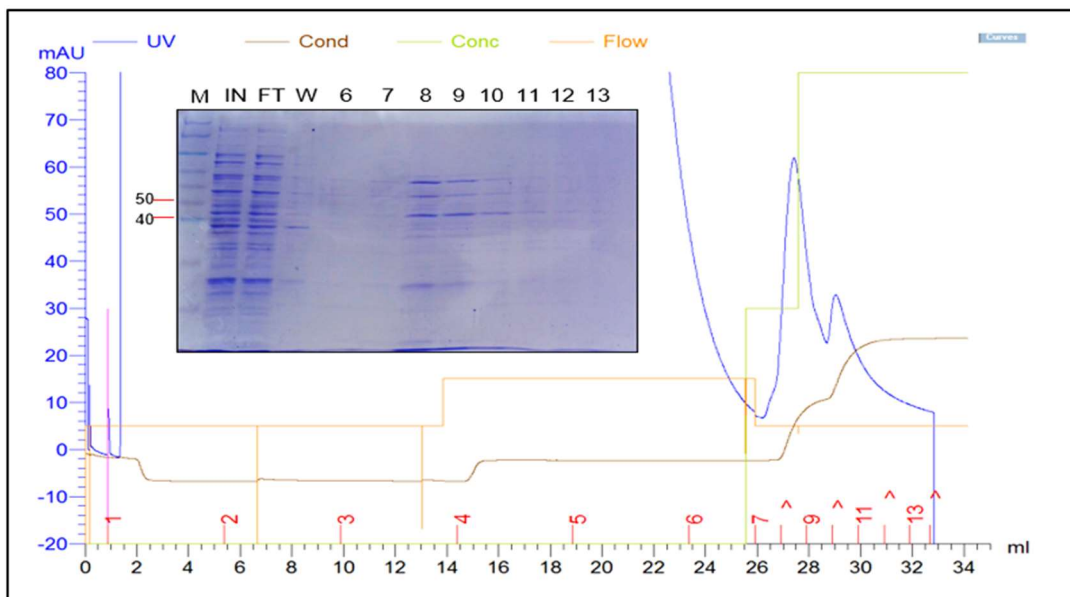


- Απομόνωση της AtHESP-D346A



**Εικόνα 17.** Χρωματογράφημα από τη στήλη νικελίου (HisTrapHP, GE) της πρωτεΐνης AtHESP-D346A. Η πράσινη κάθετος καταδεικνύει την αρχή της έκλουσης της πρωτεΐνης. Ένθετο: Ανάλυση των εκλουσμένων πρωτεϊνών σε πηκτική πολυακρυλαμίδιου 10%. IN: υπερκείμενο μετά τη λύση των κυττάρων, FT: υπερδιήθημα, M: δείκτης μοριακών μαζών. Οι αριθμοί στις διαδρομές αντιστοιχούν στην αρίθμηση των κλασμάτων έκλουσης.

- Απομόνωση της AtHESP-H385A

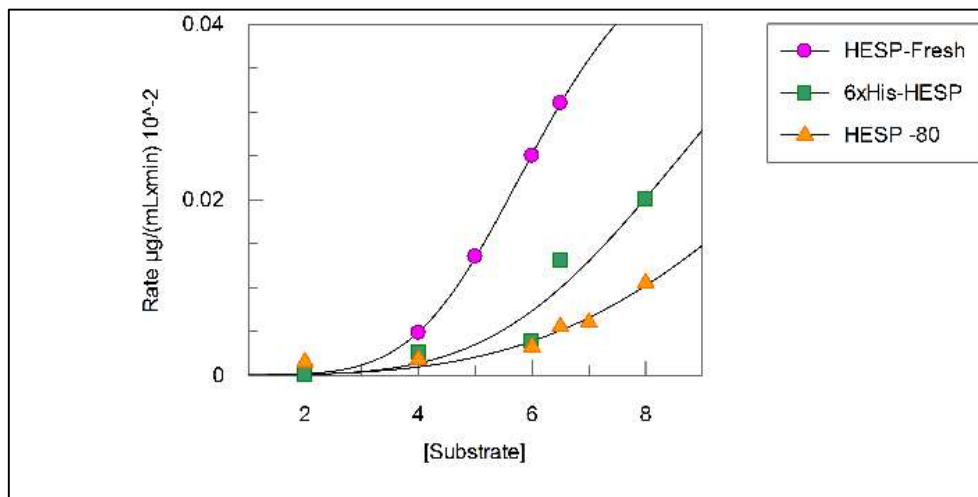


**Εικόνα 18.** Χρωματογράφημα από τη στήλη νικελίου (HisTrapHP, GE) της πρωτεΐνης AtHESP-H385A. Η πράσινη κάθετος καταδεικνύει την αρχή της έκλουσης της πρωτεΐνης. Ένθετο: Ανάλυση των εκλουσμένων πρωτεϊνών σε πηκτική πολυακρυλαμίδιου 10%. IN: υπερκείμενο μετά τη λύση των κυττάρων, FT: υπερδιήθημα, M: δείκτης μοριακών μαζών. Οι αριθμοί στις διαδρομές αντιστοιχούν στην αρίθμηση των κλασμάτων έκλουσης.

## 4.2 Κινητικές μελέτες

### 4.2.1 Μελέτη της καταλυτικής δραστηριότητας της wt-AtHesp

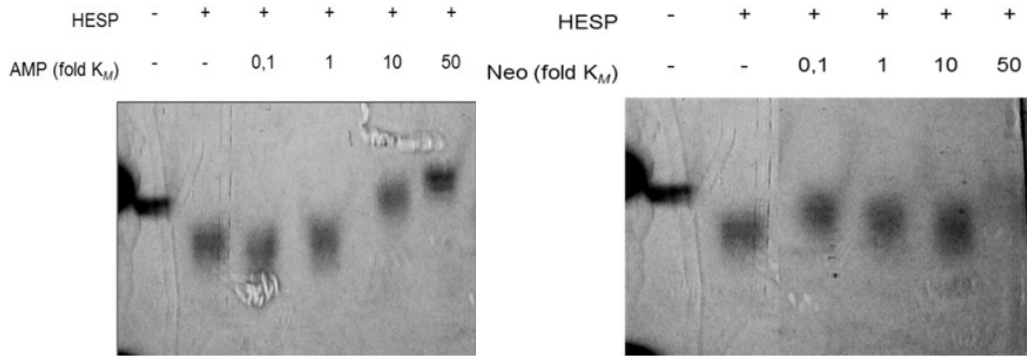
Πραγματοποιήθηκε σύγκριση της ενζυμικής δραστηριότητας μεταξύ τριών καταστάσεων της AtHesp, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος: ενός δείγματος AtHesp που παρασκευάστηκε άμεσα (και πριν καταψυχθεί στους  $-80^{\circ}\text{C}$ ), ενός δείγματος AtHESP της ίδιας παρασκευής που είχε αποθηκευτεί στους  $-80^{\circ}\text{C}$  σε 50% γλυκερόλη και ενός δείγματος 6xHis-AtHesp από προηγούμενη παρασκευή, επίσης αποθηκευμένη στους  $-80^{\circ}\text{C}$  σε 50% γλυκερόλη. Η μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας έγινε όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.2.8.1. Στην εικόνα 19 φαίνονται τα γραφήματα v-S για τα 3 δείγματα πρωτεΐνης.



**Εικόνα 19.** Οι κινητικές σταθερές για το δείγμα της AtHESP από παλαιότερη παρασκευή υπολογίστηκε σε  $K_M= 7,6\mu\text{g πολ}\acute{\upsilon}(\text{A})/\text{ml} (\pm 0,9)$  και  $V_{max}= 0,038 \mu\text{g πολ}\acute{\upsilon}(\text{A})/\text{ml} (\pm 0,05)$ , για την παρασκευή της AtHESP που είχε καταψυχθεί σε  $K_M= 9,5\mu\text{g πολ}\acute{\upsilon}(\text{A})/\text{ml} (\pm 1,3)$  και  $V_{max}= 0,054 \mu\text{g πολ}\acute{\upsilon}(\text{A})/\text{ml} (\pm 0,03)$  και τέλος, για την AtHESP που δεν καταψύχθηκε σε  $K_M= 6.1\mu\text{g πολ}\acute{\upsilon}(\text{A})/\text{ml} (\pm 0,1)$  και  $V_{max}= 0,064 \mu\text{g πολ}\acute{\upsilon}(\text{A})/\text{ml} (\pm 0,07)$ . Οι κινητικές σταθερές υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας την εξίσωση “Allosteric kinetics” του λογισμικού GraFit6.

### 4.2.2 Η επίδραση του 5'-AMP και της Νεομυκίνης Β στη δραστηριότητα της AtHesp

Για την καλύτερη κατανόηση του καταλυτικού μηχανισμού του ενζύμου εξετάστηκαν μικρά μόρια τα οποία μπορεί να ρυθμίζουν την κινητική συμπεριφορά του ενζύμου, όπως η 5'AMP και η Νεομυκίνη Β. Αυτό διότι η 5'AMP αποτελεί το ένα προϊόν της αντίδρασης απαδενυλιωσης από την AtHESP και πρέπει να εξεταστεί για την πιθανή του λειτουργία ως αναστολέας (αναστολή από το προϊόν), ενώ η Νεομυκίνη Β έχει εξετασθεί και χρησιμοποιηθεί για το χαρακτηρισμό απαδενυλασών ως αναστολέας της καταλυτικής τους δράσης.



**Εικόνα 20.** Αναστολή της δραστηριότητας της AtHESP από το 5'AMP και τη Neo. Αριστερά: Απεικονίζεται η αποικοδόμηση του 5'-CY3-RNA, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις AMP (0.1, 1, 10, 50  $K_M$ ) Δεξιά: Απεικονίζεται η αποικοδόμηση του 5'-CY3-RNA, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις Neomycin B (0.1, 1, 10, 50  $K_M$ ).

#### 4.2.3 Μελέτη της καταλυτικής δραστηριότητας μεταλλαγμένων μορφών της AtHESP

Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 4.1.2 πραγματοποιήθηκε παραγωγή των μεταλλαγμένων μορφών της AtHESP, D287A, D346A και H385A σε βακτηριακά κύτταρα και απομόνωσή τους με χρωματογραφία αχιστείας με το σύστημα FPLC. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μελέτη της ενζυμικής δραστηριότητας των μεταλλαγμάτων με τη μέθοδο του φθορίζοντος υποστρώματος, όπως περιγράφηκε παραπάνω (βλ. 3.2.8.2). Επιπλέον, για την ολοκληρωμένη σύγκριση των μεταλλαγμένων μορφών μελετήθηκε και η ενζυμική δραστηριότητα του μεταλλάγματος E114A το οποίο έχει απομονωθεί σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου [18]. Τα αποτελέσματα της δραστηριότητας των πρωτεϊνών παρουσιάζονται στην Εικόνα 21.



**Εικόνα 21.** Μέτρηση ενζυμικής δραστηριότητας των μεταλλαγμάτων της AtHESP με τη μέθοδο του φθορίζοντος υποστρώματος.

## 5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το κινκάρδιο ρολόι είναι ένας ενδογενής μηχανισμός αντίληψης του χρόνου, ο οποίος επιτρέπει στους οργανισμούς, όχι μόνο να ανταποκρίνονται στις περιβαλλοντικές αλλαγές όταν αυτές συμβαίνουν αλλά, κυρίως, να προβλέπουν και να προετοιμάζονται για τις επερχόμενες. Αυτή η ικανότητα συντονισμού με το περιβάλλον φαίνεται να προσδίδει ένα προσαρμοστικό πλεονέκτημα σε όλους τους ζώντες οργανισμούς. Οποιοδήποτε πλεονέκτημα προσαρμογής προέρχεται από τη λειτουργία του κινκάρδιου ρολογιού έχει πολλαπλές δυνητικές βάσεις, καθώς το κινκάρδιο ρολόι ρυθμίζει πολλές πτυχές της βιολογίας στα φυτά, συμπεριλαμβανομένων, του βασικού μεταβολισμού, της ορμονικής σηματοδότησης και των αποκρίσεων στις βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις [40].

Στο φυτό *Arabidopsis thaliana* το 30% των μεταγράφων διέπεται από κινκάρδια ρύθμιση[41]. Για την διατήρηση των κινκάρδιων ρυθμών σημαντικό ρόλο παίζουν η σταθερότητα και ο ρυθμός αποδόμησης των ρυθμικά εκφραζόμενων μεταγράφων [2, 8]. Το πρώτο και καθοριστικό βήμα της αποικοδόμησης των mRNA στο κυτταρόπλασμα αποτελεί η αποδόμηση της πολυ(A) ουράς (απαδενυλίωση), από μια οικογένεια ενζύμων που είναι 3'-5' εξωριβονουκλεάσες και ονομάζονται απαδενυλάσες. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η απαδενυλίωση Hesperin από το φυτό *Arabidopsis thaliana*, η οποία παρουσιάζει κινκάρδια ρύθμιση [8].

Ένα μεγάλο μέρος της εργασίας εστιάστηκε στην βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου απομόνωσης της πρωτεΐνης, ώστε ληφθεί σε ικανοποιητική ποσότητα και καθαρότητα. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε απομόνωση της wt-Hesperin, συντηγμένης με μια ετικέτα 6 ιστιδινών (6×His-tag), με τη χρήση του φορέα pATHRA, αφότου πραγματοποιήθηκε δοκιμασία υπερέκφρασης από τα βακτηριακά στελέχη Rosetta 2 και BL21-Gold. Εκτός από τα βακτηριακά στελέχη, εξετάστηκαν και αρκετές διαφορετικές συνθήκες pH και ρυθμιστικών διαλυμάτων, όπως αναφέρεται στον πίνακα 6, μαζί με την απόδοση(mg/L), όπως υπολογίστηκε μετά την χρωματογραφία αχιστείας ακινητοποιημένου μετάλλου (HisTrap HP). Η επιλογή των ρυθμιστικών διαλυμάτων έγινε με βάση το ισοηλεκτρικό σημείο της AtHESP (6.8), το εύρος τιμών pH που διατηρούν σταθερό, τη συμβατότητα με τις στήλες χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκαν και τη συμβατότητα με το διάλυμα αντίδρασης της πρωτεάσης 3C. Στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα Na-Citrate, η απόδοση μειώθηκε ενώ δεν φαίνεται να επηρεάστηκε η καθαρότητα της πρωτεΐνης. Οι διαφορές στην απόδοση μεταξύ των άλλων ρυθμιστικών διαλυμάτων δεν ήταν ιδιαίτερα μεγάλες, δεν διατηρούσαν την πρωτεΐνη σταθερή στο διάλυμα. Τέλος, το ρυθμιστικό διάλυμα Tris σε τιμή pH 8 φαίνεται να οδηγεί στη μέγιστη απόδοση καθώς επέτρεψε επιπλέον βήματα

καθαρισμού της AtHESP (τμήση της σηματοδοτικής αλληλουχίας, απομάκρυνση άκοπης AtHESP που φέρει 6×His-tag).

Έτσι μετά τον καθαρισμό της πρωτεΐνης από τη στήλη αγχιστείας, πραγματοποιήθηκε πέψη της πρωτεΐνης από την πρωτεάση 3C, η οποία είναι συντηγμένη με την πρωτεΐνη GST, ώστε να μπορεί να απομακρύνεται από το διάλυμα πρωτεΐνης μετά την πέψη με ένα επιπλέον βήμα καθαρισμού. Συνεπώς, μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το δείγμα φορτώθηκε στη στήλη αγχιστείας GST και απομονώθηκαν τα κλάσματα υπερδιηθήματος (flow-through), τα οποία περιείχαν την AtHESP που δεν φέρει 6×His-tag, καθώς και μικρή ποσότητα πρωτεΐνης 6×His-AtHESP (βλ. Εικόνα 13), εφόσον δεν εμφανίζουν κάποια αγχιστεία προς τη στήλη GST. Για την ταυτοποίηση και την καλύτερη οπτικοποίηση της εναπομείνουσας 6×His-AtHESP ακολούθησε δοκιμασία ανοσοανίχνευσης με τη χρήση αντισώματος έναντι της σηματοδοτικής ετικέτας 6×His-tag (βλ. Εικόνα 14). Στη συνέχεια, για την βελτίωση της ποιότητας του δείγματος πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία μοριακής διήθησης (βλ. εικόνα 15). Κατά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης, η πρωτεΐνη που έφερε την ετικέτα 6×His εκλούστηκε στα κλάσματα που αντιστοιχούν στον κενό όγκο της στήλης υποδηλώνοντας πως η πρωτεΐνη που φέρει την ετικέτα 6×His δεν είναι σταθερή και πιθανόν σχηματίζει συσσωματώματα στο διάλυμα και κατακρημνίζεται, καθώς δεν έχει αρκετά μεγάλη μοριακή μάζα (49kDa) για να ξεπεράσει το όριο της διακριτικής ικανότητας της στήλης που χρησιμοποιήθηκε (100kDa).

Για την εξέταση της σταθερότητας της AtHESP, πραγματοποιήθηκε δοκιμασία ενζυμικής δραστηριότητας σε ένζυμο το οποίο είχε απομονωθεί άμεσα, σε ένζυμο της ίδιας παρασκευής που είχε καταψυχθεί σε κρυοπροστατευτικό διάλυμα (50% γλυκερόλη) στους -80°C και ενός δείγματος 6×His-AtHesp από προηγούμενη παρασκευή αποθηκευμένη στους -80°C σε 50% γλυκερόλη. Όπως είναι αναμενόμενο, η δραστηριότητα του ενζύμου μετά από απόψυξη είναι μειωμένη σε σχέση με το ένζυμο που δεν καταψύχθηκε, χωρίς όμως να είναι μη δραστικό.

Στο πλαίσιο του χαρακτηρισμού της κινητικής του ενζύμου, στοχεύθηκαν υποψήφια καταλυτικά αμινοξέα του ενζύμου που καταδεικνύονται από τη συγγένεια της καταλυτικής περιοχής (EEP domain) της AtHESP με απαδενυλάσες της οικογένειας EEP από άλλους οργανισμούς. Τα αμινοξέα αυτά είναι τα E114, D287, D346 και H385 [2]. Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου πραγματοποιήθηκαν μεταλλάξεις των κωδικονίων των καταλοίπων αυτών προς αλανίνη. Τα κατάλοιπα E, D και H βρίσκονται συνήθως σε ενεργά κέντρα ενζύμων και βοηθούν στην αλληλεπίδραση με ιόντα μετάλλων που μπορεί να είναι απαραίτητα για την κατάλυση (E, D και H). Τα κατάλοιπα ιστιδίνης συγκεκριμένα είναι σχεδόν αναντικατάστατα όταν βρίσκονται στο ενεργό κέντρο ενζύμων. Λόγω του ιμιδαζολικού δακτυλίου της πλευρικής της αλυσίδας, η ιστιδίνη μπορεί να μεταφέρει πρωτόνια, κάτι που είναι απαραίτητο στις ενζυμικές αντιδράσεις[40]. Στις περιπτώσεις που κρίνεται απαραίτητη η αντικατάσταση

καταλοίπων μέσω μεταλλαξιγένεσης για τον έλεγχο της ενζυμικής δραστηριότητας, αυτή γίνεται με ένα αμινοξύ που συνήθως δε συμμετέχει σε ενεργά κέντρα ενζύμων. Ένα τέτοιο αμινοξύ αποτελεί η αλανίνη η οποία λόγω του μεθυλίου που φέρει ως πλευρική αλυσίδα την καθιστά αδρανή σε ενεργά κέντρα ενζύμων[40]. Οι μεταλλαγμένες μορφές της AtHESP που φέρουν μεταλλάξεις στα κατάλοιπα αυτά (D287A, D346A, H385A) απομονώθηκαν με χρήση χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου. Η απόδοση της απομόνωσης των πρωτεϊνών αυτών ήταν μειωμένη σε σύγκριση με την απόδοση για τη wt-HESP, αλλά όχι σε βαθμό που έκανε τη μελέτη τους δυσχερή. Ωστόσο, παρουσίασε ιδιαίτερο ενδιαφέρον η απομόνωση της AtHESP-H385A με απόδοση πολύ χαμηλότερη των άλλων μεταλλαγμένων μορφών. Επιπλέον, η απομόνωση της AtHESP-H385A δεν πραγματοποιήθηκε στις ίδιες συνθήκες με τις υπόλοιπες μεταλλαγμένες μορφές της AtHESP, γεγονός που ίσως υποδηλώνει και μια πιο σημαντική συμμετοχή του καταλοίπου H385 στη βιοφυσική συμπεριφορά της AtHESP. Οι μεταλλαγμένες μορφές της AtHESP δεν εμφανίζουν δράση απαδενυλάσης, υποδεικνύοντας πως είναι όντως σημαντικά για την κατάλυση.

Η AtHESP είναι ένα αλλοστερικό ένζυμο του οποίου η δράση εξαρτάται από μαγνήσιο [2]. Για την καλύτερη κατανόηση του καταλυτικού μηχανισμού της AtHESP, εξετάστηκε η επίδραση μικρών μορίων όπως η 5'AMP και η νεομυκίνη B. Το 5'AMP εξετάστηκε καθώς αποτελεί ένα από τα δύο προϊόντα της αντίδρασης απαδενυλίωσης, ως εκ τούτου η AtHESP, όπως και πολλά ένζυμα ήταν πιθανό να αναστέλλεται από το προϊόν της αντίδρασης την οποία καταλύει. Πρόκειται για μια συνήθη τακτική διατήρησης της ομοιόστασης εντός του κυττάρου, κατά τη διάρκεια μεταβολικών αντιδράσεων. Η νεομυκίνη B, εξετάστηκε καθώς παρατηρήθηκε ότι αναστέλλει τη δράση απαδενυλασών που εξαρτώνται από το μαγνήσιο, όπως η PARN και η CNOT6L [42, 43]. Όπως έγινε φανερό από τις κινητικές μελέτες φθορισμού, η παρουσία του 5'AMP σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (10-50  $K_M$ ), μείωσε αποτελεσματικά την δραστηριότητα της AtHesp, ενώ σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (0,1-1  $K_M$ ) παρατηρήθηκε πιο ήπια αναστολή. Όσον αφορά τη νεομυκίνη B, φαίνεται επίσης να αναστέλλει τη δράση της AtHesp (βλ. Εικόνα 20).

Η AtHESP είναι μια απαδενυλάση EEP με κοινά χαρακτηριστικά με άλλες EEP απαδενυλάσες από άλλους οργανισμούς όπως η CNOT6L, όπως φαίνεται από την υψηλή συντήρηση των καταλοίπων της περιοχής EEP, αλλά και της όμοιας κινητικής συμπεριφοράς των δυο ενζύμων παρουσία Νεομυκίνης B. Σε προηγούμενη εργασία του εργαστηρίου είχε δειχθεί ο καταλυτικά σημαντικός ρόλος του καταλοίπου E114, ενώ στην παρούσα εργασία, συμπληρώνονται τα καταλυτικά σημαντικά κατάλοιπα του ενζύμου, τα οποία είναι συντηρημένα και σε άλλες EEP απαδενυλάσες από άλλους οργανισμούς. Τα κατάλοιπα D287, D346 και H385 είναι σημαντικά για την κατάλυση, καθώς όπως διαπιστώθηκε μέσω της κινητικής μελέτης (βλ. Εικόνα 21), οι μεταλλαγμένες μορφές D287A-AtHESP και D346A-

AtHESP, δεν είναι καταλυτικά ενεργές, ενώ η H385A-AtHESP φάνηκε να αποδομεί το φθορίζων υπόστρωμα σε ελάχιστο βαθμό. Για την πλήρη αποσαφήνιση του βιολογικού ρόλου και της λειτουργίας του ενζύμου και του αντίκτυπου των μεταλλάξεων στο ενεργό του κέντρο είναι απαραίτητες μελέτες σε επίπεδο του συνόλου του οργανισμού, ώστε να αποσαφηνιστεί η λειτουργική σημασία του και να προσδιοριστούν τα mRNA-στόχοι του.

## 6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Paranjpe, D.A. and V.K. Sharma, J Circadian Rhythms, 2005. **3**(1): p. 7.
2. Delis, C., et al., RNA Biol, 2016. **13**(1): p. 68-82.
3. Robles, M.S., J. Cox, and M. Mann, PLoS Genet, 2014. **10**(1): p. e1004047.
- 4
5. K., X., *Αναπτυξιακή & Μοριακή Βιολογία φυτών*.
7. Elabadi, D., et al., Science, 2001. **293**(5531): p. 880-3.
8. Beta, R.A.A. and N.A.A. Balatsos, Wiley Interdiscip Rev RNA, 2018: p. e1484.
9. Alberts B, J., A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed.: Garland Science.
10. Goldstrohm, A.C. and M. Wickens, Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(4): p. 337-44.
11. B., L., *Genes VIII*. 2004: Pearson.
12. Harnisch, C., et al., Enzymes, 2012. **31**: p. 181-211.
- 1
13. Β Μπέτα P. A. A., «Βιοχημικός χαρακτηρισμός της AtHESP». 2014. Διπλωματική Εργασία, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
15. Iia, B. and C.O. Jeon, Open Biol, 2016. **6**(8).
16. Novagen. *Competent cells*.
17. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Section 7.1, DNA Cloning with Plasmid Vectors.
18. Μ Μπέτα P. A. A., «Δομικές και λειτουργικές μελέτες της AtHESPERIN». 2016. Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
19. Ρ Μπαλατσός NAA. Δράση τροποποιητών βιολογικής απόκρισης και αντικαρκινικών φαρμάκων στην δομή και τη λειτουργία ενζύμων σταθερότητας ρηνύματος RNA, ο ρόλος τους στη βιολογία του καρκίνου και η σημασία στη διάγνωση και τη θεραπεία. Πανεπιστήμιο Αθηνών; 1999.
20. Shapiro, A.L., E. Vinuela, and J.V. Maizel, Jr., Biochem Biophys Res Commun, 1967. **28**(5): p. 815-20.
21. Weber, K. and M. Osborn, J Biol Chem, 1969. **244**(16): p. 4406-12.
22. Chevallet, M., S. Luche, and T. Rabilloud, Nat Protoc, 2006. **1**(4): p. 1852-8.
23. B. (2014), p. 750. Bird, C.R. Merrill, and S. Shifrin, Anal Biochem, 1979. **98**(1): p. 231-7.
24. Chomczynski, P., Nucleic Acids Res, 1992. **20**(14): p. 3791-2.
25. Mody, J.R. and S.E. Kern, Anal Biochem, 2004. **333**(1): p. 1-13.
26. Simpikirati, P., X. Pan, and R.W. Vachet, Anal Chem, 2019. **91**(13): p. 8516-8523.
27. Green, R. and E.J. Rogers, Methods Enzymol, 2013. **529**: p. 329-36.
28. Bornhorst, J.A. and J.J. Falke, Methods Enzymol, 2000. **326**: p. 245-54.
29. Borath, J., Protein Expr Purif, 1992. **3**(4): p. 263-81.
30. Vaugh, D.S., Protein Expr Purif, 2011. **80**(2): p. 283-93.
31. Vaugh, D.S., Trends Biotechnol, 2005. **23**(6): p. 316-20.
32. *Gel Filtration Principles and methods Sweden: GE Healthcare Life Sciences; 2010.*
33. *Gel filtration columns and media, Selection Guide. Sweden: GE Healthcare Life Sciences; 2012.*
34. Bio, D.C., et al., Cold Spring Harb Protoc, 2010. **2010**(6): p. pdb prot5444.
35. Petrov, A., A. Tsa, and J.D. Puglisi, Methods Enzymol, 2013. **530**: p. 301-13.
36. John M, Clark, J.R., Switzer, R.L. *Ηλεκτροφόρηση. Πειραματική Βιοχημεία: Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης; 1991. p. 45.*
37. *Bio-Rad. A guide to polyacrylamide gel electrophoresis and detection Bio-Rad.*
38. Cheng, Y., et al., Protein Pept Lett, 2006. **13**(2): p. 125-8.

R

e

e

h

α

e



39. Greiner-Stoeffele, T., M. Grunow, and U. Hahn, *Anal Biochem*, 1996. **240**(1): p. 24-8.
40. McClung, C.R., *F1000Prime Rep*, 2014. **6**: p. 2.
41. Romanowski, A. and M.J. Yanovsky, *Front Plant Sci*, 2015. **6**: p. 437.
42. Ren, Y.G., et al., *RNA*, 2002. **8**(11): p. 1393-400.
43. Zhang, Q., et al., *FEBS Lett*, 2016. **590**(8): p. 1270-9.